

# FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES GRANULOZYTÄREN ANTIGENS NB1 (CD177)

**TIMO WEIß**



## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

**und**

aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin,

Universitätsklinikum Gießen-Marburg

Betreuer: Prof. Dr. med. Gregor Bein

## **Funktionelle Charakterisierung des granulozytären Antigens NB1 (CD177)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Timo Weiß**

Tierarzt aus Hanau

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Reinacher  
Prof. Dr. med. Gregor Bein

Tag der Disputation: 08.07.2008

Meinen Eltern, meiner Großmutter und Michaela

## Abkürzungen

A	Ampere
AIN	Autoimmun-Neutropenie
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)- carboxyfluorescein
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CHO-Zellen	Chinesische Hamster Ovar-Zellen
cm	Zentimeter
CNBr	Cyanbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyleniodonium-chlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EGF	Endothelial Growth Factor
ESL-1	E-Selektin Ligand-1
et al.	et alii (und andere)
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMLP	N-formyl Met-Leu-Phe
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälber Serum)
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GCSF	Granulozyten-Kolonie (Colony)-Stimulierender- Faktor
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule 1
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie (Colony)- Stimulierender-Faktor

GPI	GlycosylPhosphatidyl-Inositol
h	human
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution
HNA	Humanes Neutrophilen Antigen
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
HWZ	Halbwertszeit
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
IP	Immunpräzipitation
IPB	Immun-Präzipitations-Puffer
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs
JAM-C	Junction Adhesion Molecule-C
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
Leu	Leucin
LFA-1	Lymphocyte Function associated Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
Mac-1	Macrophage Antigen-1
MadCAM-1	Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule 1
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	Modified Eagle Medium
Met	Methionin
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
n	Nano
NAIN	Neonatale Alloimmun-Neutropenie
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant



OD	Optische Dichte
OPD	O-Phenylen-diamin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten (Chain)-Reaktion
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (Plättchen Endothelzellen Adhäsions-Molekül)
PECAM-1-Fc	Fusionsprotein aus PECAM-1 und einem Fc-Fragment
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
PI-PL	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNH	Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie
PRV	Polycythaemia rubra vera
P/S	Penicilin/Streptomycin
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
q	langer Arm eines Chromosoms
RAM	Rabbit-Anti-Mouse (Kaninchen-Anti-Maus)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	SodiumDodecylSulfat-PolyAcrylamid- GelElektrophorese
sec	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Std.	Stunde
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Tabl.	Tablette
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRALI	Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
uPAR	Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor

Upm.	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated regions
V	Volt
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

<b>1 Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle im Entzündungsgeschehen	12
1.2 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Verankerung	18
1.2.1 Struktur und Eigenschaften des GPI-Ankers	18
1.2.2 Funktion des GPI-Ankers	20
1.3 NB1 (HNA-2a, CD177)	22
1.3.1 Phänotypische Eigenschaften	22
1.3.2 Genotypische Eigenschaften	24
1.3.3 Struktur und biochemische Eigenschaften	26
1.3.4 Funktion von NB1	28
1.3.5 Die Rolle von NB1 bei verschiedenen Erkrankungen	30
1.4 Zielsetzung der Arbeit	32
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>33</b>
2.1 Material	33
2.1.1 Antikörper	33
2.1.2 Proteine	33
2.1.3 Zellkulturmedien	34
2.1.4 Lösungen und Puffer	34
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	37
2.2 Methoden	42
2.2.1 Probensammlung und Probenaufbereitung	42
2.2.1.1 Isolierung von Granulozyten aus EDTA-Blut	42
2.2.1.2 Fixierung von Granulozyten	43
2.2.1.3 Herstellung von Granulozytenlysat	43
2.2.1.4 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration von Granulozytenlysat	43
2.2.1.5 Gewinnung von Plasma	43
2.2.1.6 Kopplung des mAk 7D8 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B	44
2.2.1.7 Isolierung von NB1 durch Immunaффinitätschromatographie	44
2.2.1.8 IgG-Aufreinigung von Plasmaproben	45
2.2.2 Phänotypische Untersuchungen	45
2.2.2.1 Quantitative Durchflusszytometrie	45
2.2.2.2 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)	47

2.2.2.3 Erstellung einer Standardkurve zur Bestimmung der NB1-Konzentration.....	49
2.2.2.4 Depletion von Plasma-NB1 durch Sepharose 4B.....	49
2.2.2.5 Ultrazentrifugation .....	50
2.2.2.6 Phasen-Separation mit Triton X-114 .....	50
2.2.3 Zellkulturarbeiten .....	51
2.2.3.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten.....	51
2.2.3.2 Auftauen von Zellen.....	51
2.2.3.3 Einfrieren von Zellen .....	51
2.2.3.4 Transfektion von CHO-Zellen.....	51
2.2.3.5 Kultivierung von 7D8 Hybridomzellen.....	52
2.2.3.6 Bestimmung der Zellzahl.....	52
2.2.3.7 Zellselektion mit CELLection™ Pan Mouse IgG Kit.....	52
2.2.3.8 Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnüren .....	53
2.2.4 Proteinanalytische Methoden.....	53
2.2.4.1 Herstellung biotinmarkierten Endothelzelllysats .....	53
2.2.4.2 Immunpräzipitation .....	54
2.2.4.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	55
2.2.4.4 Immunoblot (Western Blot).....	55
2.2.4.5 Rehybridisierung .....	56
2.2.4.6 Silberfärbung.....	56
2.2.4.7 Funktionelle Untersuchungen .....	57
A) In vitro Stimulationsexperiment .....	57
B) In vivo Stimulationsexperiment.....	57
2.2.4.8 Zellsortierung mit dem Durchflusszytometer.....	57
2.2.4.9 Quantitative Bestimmung der Burstaktivität nach Inkubation mit Anti-NB1 Ak.....	58
2.2.4.10 Adhäsionstest mit Kristall-Violett-Anfärbung .....	58
2.2.4.11 Adhäsionstest mit Fluoreszenzmarkierung.....	59
2.2.5 Funktionelle Untersuchungen am Durchflusszytometer .....	59
2.2.5.1 Funktionelle Untersuchungen an Endothelzellen .....	59
2.2.5.2 Funktionelle Untersuchungen an E-Selektin .....	60
2.3 Statistische Auswertung .....	60

<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
3.1 Standardkurve.....	61
3.2 Etablierung des ELISA-Testsystems.....	63
3.3 Quantifizierung.....	64
3.4 Alters- bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede .....	65
3.5 Heterogene Expression von NB1.....	66
3.5.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der NB1- Oberflächenexpression und-Oberflächenkonzentration.....	66
3.5.2 Konstanz der NB1-Expression und der NB1-Oberflächenkonzentration .....	69
3.5.3 Alters- bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede der NB1- Expression .....	72
3.5.4 Vergleich des NB1-Gesamtgehalts mit der NB1-Expression, der -Ober- flächenkonzentration und der -Gesamtoberflächenmenge .....	75
3.6 Untersuchungen zur löslichen Form von NB1 .....	79
3.6.1 Depletion von NB1 aus dem Plasma durch Sepharose A.....	79
3.6.2 Nachweis von NB1 im Plasma mittels Immunpräzipitation .....	80
3.6.3 Nachweis durch Ultrazentrifugation .....	82
3.6.4 Biochemischer Nachweis durch Triton X-114-Trennung .....	83
3.6.5 Quantitative Bestimmung des NB1-Plasmagehalts.....	84
3.6.6 Vergleich von löslichen und zellulären NB1 .....	87
3.6.7 NB1 im Urin.....	89
3.7 Untersuchungen zur NB1-Expression nach Zellstimulation .....	89
3.7.1 In vitro Untersuchungen .....	90
3.7.2 In vivo Untersuchungen.....	92
3.7.3 NB1 defiziente Subpopulation.....	94
3.8 Funktionelle Untersuchungen zu NB1 .....	95
3.8.1 Oxidativer Burst.....	95
3.8.2 NB1-Counterrezeptor .....	97
3.8.2.1 Isolierung des NB1-Proteins mittels Immunaффinitätschromatographie .....	97
3.8.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	98
3.8.2.3 Zell-Adhäsion .....	100

3.8.2.4 Immunpräzipitationsstudien mit Endothelzellen zur Detektion eines möglichen Partnermoleküls für NB1 .....	102
3.8.2.5 Interaktionsstudien mit spezifischen Partnern .....	103
A) Interaktion zwischen NB1 und E-Selektin (CD62E) .....	103
B) Interaktion zwischen NB1 und PECAM-1 (CD31) .....	104
4 Diskussion.....	108
5 Zusammenfassung .....	120
6 Summary .....	121
7 Literaturverzeichnis .....	122
8 Anhang .....	134
8.1 NB1-Standardkurve.....	134
8.2 NB1-Phänotyp .....	135
8.3 Konstanz der NB1-Expression und NB1-Oberflächenkonzentration.....	138
8.4 NB1-Plasmagehalt.....	142
8.5 In Vitro Zellstimulation .....	144
9 Publikationen, Vorträge und Poster .....	146
10 Erklärung .....	147
11 Danksagung.....	148

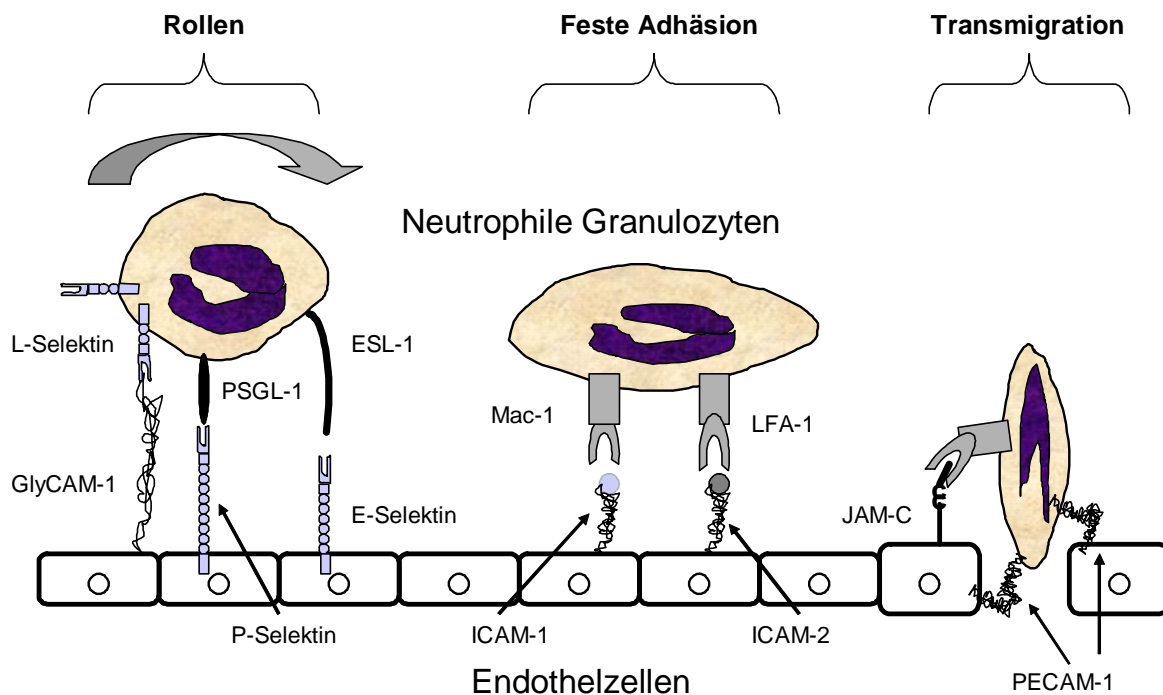
# 1 Einleitung

## 1.1 Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle im Entzündungsgeschehen

Granulozyten gehören zur Gruppe der Leukozyten. Sie lassen sich aufgrund ihrer Anfärbbarkeit in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten unterteilen. Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten stellen dabei den größten Anteil. Sie sind Bestandteil der unspezifischen Körperabwehr, indem sie zur Phagozytose fähig sind und Sauerstoffradikale produzieren können. Einige der für die Abwehr verantwortlichen Enzyme sind in den Zellgranula untergebracht. Diese lassen sich anhand ihres Enzymgehalts weiter differenzieren: Die Primär-Granula oder auch azurophile Granula besitzt das Enzym Myeloperoxidase. Peroxidase-negative Granula lassen sich durch ihren Gehalt an Laktoferrin und Gelatinase weiter unterteilen in Sekundär (Spezifische) - Granula und Tertiär (Gelatinase) - Granula (Borregaard & Cowland, 1997). Die Bildung der Granulozyten im Knochenmark dauert etwa 5-10 Tage, während dieser Zeit verringert sich die Anzahl ihrer Mitochondrien und es kommt zu einer Erhöhung der Glykolyserate. Dies macht eine Energiegewinnung unter anaeroben Bedingungen möglich, beispielsweise im hypoxischen, entzündlichen Gewebe. Ihre Lebensdauer als reife Zelle beträgt 2-3 Tage bei einer Halbwertszeit im Blut von etwa 6-10 Stunden (Boggs, 1967). Nur etwa 5 % der reifen Zellen gelangen in die Blutbahn, wobei hiervon 50 % im Blut zirkulieren, während die anderen 50 % am Gefäßendothel haften und den marginalen Granulozytenpool darstellen. Bei Bedarf können jedoch weitaus mehr Zellen aus dem Knochenmark in die Blutbahn ausgeschüttet werden.

Beim Auftreten lokaler Entzündungen verlassen die Neutrophilen zur Vermittlung ihrer Abwehrreaktion das Blutgefäßsystem in Richtung betroffenes Gewebe. Dieser als Extravasation bezeichnete Prozess findet hauptsächlich in den postkapillären Venolen, den kleinsten venösen Blutgefäßen, statt. Um die Gefäßwand zu durchdringen, müssen die Zellen eine Adhäsionskaskade durchlaufen, an welcher zahlreiche Adhäsionsrezeptoren beteiligt sind und die in drei Abschnitte unterteilt werden kann: Initiale Kontaktaufnahme und Rollen, feste Adhäsion, Transmigration (Abb. 1).

Die Einleitung der Leukozyten-Extravasation erfolgt durch die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin), welche wiederum die typischen Entzündungssymptome bewirken. Durch die Vasodilatation kommt es nun zu einer relativen Umverteilung der Leukozyten aus der Gefäßmitte an



**Abb. 1: Adhäsionskaskade neutrophiler Granulozyten während der Extravasation**

den Gefäßrand. Gleichzeitig erfolgt durch die Freisetzung von Zytokinen, wie beispielsweise IL-1 oder TNF $\alpha$ , eine Aktivierung des Gefäßendothels (Vestweber & Blanks, 1999). Aufgrund dieser Aktivierung kommt es zur Expression spezifischer Adhäsionsrezeptoren (GlyCAM-1, P-Selektin) auf der Endotheloberfläche. Durch einzelne Bindungen mit deren leukozytären Partnern kommt es zu einer ersten initialen Kontaktaufnahme, dem sog. Tethering, der Neutrophilen mit der Gefäßwand. Aufgrund des parabolischen Scherstroms im Blutgefäß und aufgrund der nun vermehrten Anzahl an schwach affinen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zwischen Endothel und Granulozyt zeigt sich eine rollende Bewegung der Zellen an der Gefäßwand. Dieser als Leukozytenrollen bezeichnete Prozess wird durch verschiedene Rezeptoren der Selektinfamilie vermittelt.

L-Selektin ist konstitutiv auf allen Leukozyten vorhanden (Bruehl et al., 1996). Obwohl es im Gegensatz zu den anderen beteiligten Selektinen ein relativ kurzes Protein ist, hat es aufgrund seiner Position auf den Mikrovilli-Spitzen in der Frühphase des Rollens eine große Bedeutung. Seine Liganden auf dem Endothel



sind GlyCAM-1, CD34 und MadCAM-1. Ein weiterer Ligand ist PSGL-1, dieser bewirkt die für die Leukozytenrekrutierung im entzündeten Gewebe wichtige homophile Leukozytenbindung (Simon et al., 1993). Nach Aktivierung der neutrophilen Granulozyten wird L-Selektin innerhalb weniger Minuten proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten (Kahn et al., 1994).

P-Selektin wird intrazellulär in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert. Es gelangt innerhalb von 10 Minuten nach Aktivierung auf die Zelloberfläche und wird durch Transkriptionsaktivierung neu synthetisiert (Geng et al., 1990). Sein Ligand ist PSGL-1, was auf den Mikrovilli der Leukozyten zu finden ist (Bruehl et al., 1997). Aufgrund seiner langgestreckten Struktur, seiner schnellen Bereitstellung und der Position seines Liganden hat P-Selektin ebenso wie L-Selektin in der Frühphase des Rollens eine Bedeutung.

Für die Überleitung des Leukozytenrollens zur festen Adhäsion ist E-Selektin verantwortlich, welches 1989 erstmals charakterisiert wurde (Bevilacqua et al., 1989). E-Selektin ist nur auf der Endothelzelloberfläche vorhanden, wobei es erst nach Zytokinaktivierung durch de-novo-Synthese gebildet wird. Dadurch wird sein Expressionsmaximum erst nach 3-4 Std. erreicht. Ein hochaffiner Ligand für E-Selektin ist ESL-1, welcher im Randbereich leukozytärer Mikrovilli lokalisiert ist (Steggmaier et al., 1997) und keine Bindungsaffinität zu den anderen Selektinen aufweist.

Mit dem Rollen und der damit verbundenen lokalen Konzentration der Leukozyten werden diese durch endothelial freigesetzte Mediatoren (z.B. Chemokine) weiter aktiviert (Zimmerman et al., 1996). Durch diesen Vorgang bzw. durch eine Signaltransduktion der zytoplasmatischen Anteile von L-Selektin oder PSGL-1 kommt es zu einer Aktivierung leukozytärer Integrine (Wagner & Roth, 2000), wodurch nun die Adhäsionskaskade fortgesetzt wird.

Integrine sind heterodimere, transmembrane Adhäsionsrezeptoren, welche aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Strukturell werden die Integrine anhand ihrer  $\beta$ -Kette unterschieden, wobei für aktivierte Leukozyten vor allem  $\beta_2$ -Integrine bedeutend sind. Die wichtigsten Integrine während der Adhäsion sind CD11a/CD18 (LFA-1), welches auf allen Leukozyten vorhanden ist, und CD11b/CD18 (Mac-1), das konstitutiv auf der Oberfläche von Granulozyten und Monozyten zu finden ist (Arnaout, 1990). Die wichtigsten endothelialen Liganden sind ICAM-2 für CD11a/CD18 sowie ICAM-1 für CD11b/CD18. Allerdings binden die Liganden mit

geringerer Affinität auch an das jeweils andere Integrin (Wagner et al., 2000). Es handelt sich hierbei um transmembrane Glykoproteine, welche entweder durch Zytokineinfluss exprimiert werden (ICAM-1) oder auf den Endothelzellen konstitutiv vorhanden sind (ICAM-2). Durch die Bindung an ICAM-1 kommt es zusätzlich zu Veränderungen des endothelialen Zytoskeletts (Wang et Doerschuk, 2001). Weitere Moleküle, welche bei der Adhäsion eine Rolle spielen, sind CD11c/CD18 auf Monozyten und Granulozyten sowie VCAM-1 auf Endothelzellen. Durch diese integrinvermittelte feste Bindung der Leukozyten kommt es zu einer Abflachung der Abwehrzellen, wobei die dadurch bedingte Vergrößerung wiederum bindungsverstärkend wirkt.

Über den anschließenden Prozess der Transmigration ist bislang erst wenig bekannt. Diese erfolgt meist zwischen 2-3 benachbarten Endothelzellen, seltener durch Transzytose (Feng et al., 1998). Eine wichtige Rolle spielt PECAM-1 (CD31) (Muller, 1993), ein transmembranes Protein der Immunglobulin-Superfamilie, welches sowohl auf Endothelzellen als auch auf Granulozyten, Monozyten, T-Zellen und Thrombozyten vorhanden ist (Stockinger et al., 1990). Auf den Endothelzellen befindet sich PECAM-1 in den tight junctions, bildet hier homophile Bindungen und somit interzelluläre Kontakte aus (Albelda et al., 1991). Während der Transmigration kommt es zu einer Auflösung der homophilen Bindungen und einer teilweisen Verlagerung der Proteine (Su et al., 2002). Anschließend kommt es zu homophilen Bindungen zwischen dem leukozytären und dem endothelialen PECAM-1 (Muller, 1993) und dadurch bedingt zu einer Hochregulation von  $\alpha_6\beta_1$ -Integrinen auf den Neutrophilen (Dangerfield et al., 2002; Wang et al., 2005), welche eine Rolle bei der Transmigration der Leukozyten durch die perivaskuläre Basalmembran spielen.

JAM-C ist ein weiteres Protein, welches in interendothelialen Junctions zu finden ist. Neben den Endothelzellen ist es auch auf Thrombozyten, T-Zellen und Natürlichen Killer-Zellen zu finden. Heterophiler Bindungspartner des endothelialen JAM-C ist das ebenfalls für die Adhäsion wichtige Integrin Mac-1 (Chavakis et al., 2004). Homophile Bindungen konnten jüngst bei der Interaktion zwischen Tumorzellen und Endothelzellen gezeigt werden (Santoso et al., 2005). Distal von PECAM-1 in den interendothelialen Kontaktflächen und auf Leukozyten befindet sich zusätzlich CD99, ein Protein welches am Ende der Transmigration von Bedeutung ist (Muller, 2002).

Für die Transmigration der Neutrophilen durch die perivaskuläre Basalmembran scheint ebenfalls PECAM-1 eine entscheidende Rolle zu spielen. So wurde zum

einem gezeigt, dass Antikörper gegen PECAM-1 die Transmigration verhindern (Liao et al., 1997), zum anderen konnte bei Experimenten mit PECAM-1-defizienten Mäusen eine verminderte Transmigration beobachtet werden (Dangerfield et al., 2002). Zusätzlich hat PECAM-1 Einfluss auf die Expression von  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin, welches einen leukozytären Rezeptor für Laminin darstellt (Dangerfield et al., 2002), neben Kollagen Typ IV ein wesentlicher Bestandteil der Basalmembran. Weiterhin kommt es durch die Inhibition von leukozytären Proteasen zu einer verminderten Transmigration der Leukozyten durch die Membran (Delclaux et al., 1996; Wang et al., 2005).

Nach der Transmigration richten sich die Neutrophilen nach dem Konzentrationsgradienten der jeweiligen chemotaktischen Substanz aus und wandern kontinuierlich zu dessen Ausgangspunkt. Hat die Zelle Kontakt mit dem Fremdkörper aufgenommen, beginnt sie mittels Pseudopodien diesen zu umschließen und in den Zelleib aufzunehmen. Es entsteht eine Phagozytosevakuole, das sogenannte Phagosom, in welches der Fremdkörper eingeschlossen wird. Nach der Aufnahme kommt es zu einer Verschmelzung der Granula mit dem Phagosom, wobei Primär- und Sekundär-Granula nahezu gleichzeitig mit dem Phagosom verschmelzen (Segal, 2005). Die dadurch freigesetzten Enzyme, beispielsweise Lysozym zur Zerstörung der Bakterienwand oder auch neutrale und saure Hydrolasen, zerstören nun den Fremdkörper ohne jedoch in das Zytosol des Neutrophilen zu gelangen. Weiterhin kommt es zum sogenannten „respiratory burst“, wobei der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch innerhalb weniger Sekunden auf das Hundertfache ansteigt. Grund hierfür ist die Reduktion von Sauerstoff mit Hilfe von NADPH durch die NADPH-abhängige Oxidase zu Superoxidanionen. Diese Superoxidanionen können nun weiter zu Wasserstoffperoxid reduziert werden, mit bereits gebildetem Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\bullet$ ) produzieren oder auch Chloridionen durch Wasserstoffperoxid zu Hypochloridionen oxidieren. Sämtliche dieser Sauerstoffverbindungen sind in der Lage, durch Peroxidation der Membranlipide die Bakterienwand zu zerstören.

Unverbrauchte Granulozyten sterben nach wenigen Stunden durch Apoptose. Somit wird verhindert, dass durch nekrotische Prozesse ihr zytotoxischer Inhalt freigesetzt wird und zu einer Gewebsschädigung führt. Durch verschiedene Faktoren kann die Apoptose von neutrophilen Granulozyten verzögert werden, damit vermehrt Zellen in

das Entzündungsgeschehen eingreifen können. Dazu gehören zum einen Chemokine wie IL-1 $\beta$  (Colotta et al., 1992), IL-2 (Pericle et al., 1994), IL-8 (Kettritz et al., 1998), IL-15 (Girard et al., 1996), TNF- $\alpha$  (Colotta et al., 1992), INF- $\gamma$  (Klebanoff et al., 1992), LPS bzw. G-CSF (Lee et al., 1993) und G-MCSF (Yasui et al., 2002), zum anderen aber auch die Transmigration durch die Endothelwand (Watson et al., 1997) oder Hypoxämie (Hannah et al., 1995).

Weiterhin können auch andere Eigenschaften bzw. Funktionen von Neutrophilen beeinflusst werden. So unterstützten fMLP (Smith & Hollers, 1980) und G-CSF (Chakraborty et al., 2003) die Adhäsion der Neutrophilen. Eine vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen wird in Anwesenheit von bakteriellen Lipopolysacchariden (Guthrie et al., 1984) oder von Arachidonsäure (Rubinek & Levy, 1993) beobachtet. Umgekehrt bewirkt bei adhärenenten Neutrophilen die Anwesenheit von Integrinen eine Hemmung der NADPH-Oxidase (Zhao et al., 2003), wodurch eine zu frühe Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen vermieden werden soll.

Aber auch Sexualhormone und Kortikoide können die Funktion der Granulozyten beeinflussen. 17- $\beta$ -Östradiol bewirkt zum einen eine Hemmung der Chemotaxis (Buyon et al., 1984; Miyagi et al., 1992; Ito et al., 1995), zum anderen auch wie Progesteron und Testosteron eine Hemmung der Sauerstoffradikalbildung (Abrahams et al., 2003). Eine solche Hemmung konnte ebenfalls durch Glukokortikoide bewirkt werden, während Mineralokortikoide diesen Effekt nicht aufzeigen (Bekesi et al., 2000).

## **1.2 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Verankerung**

### **1.2.1 Struktur und Eigenschaften des GPI-Ankers**

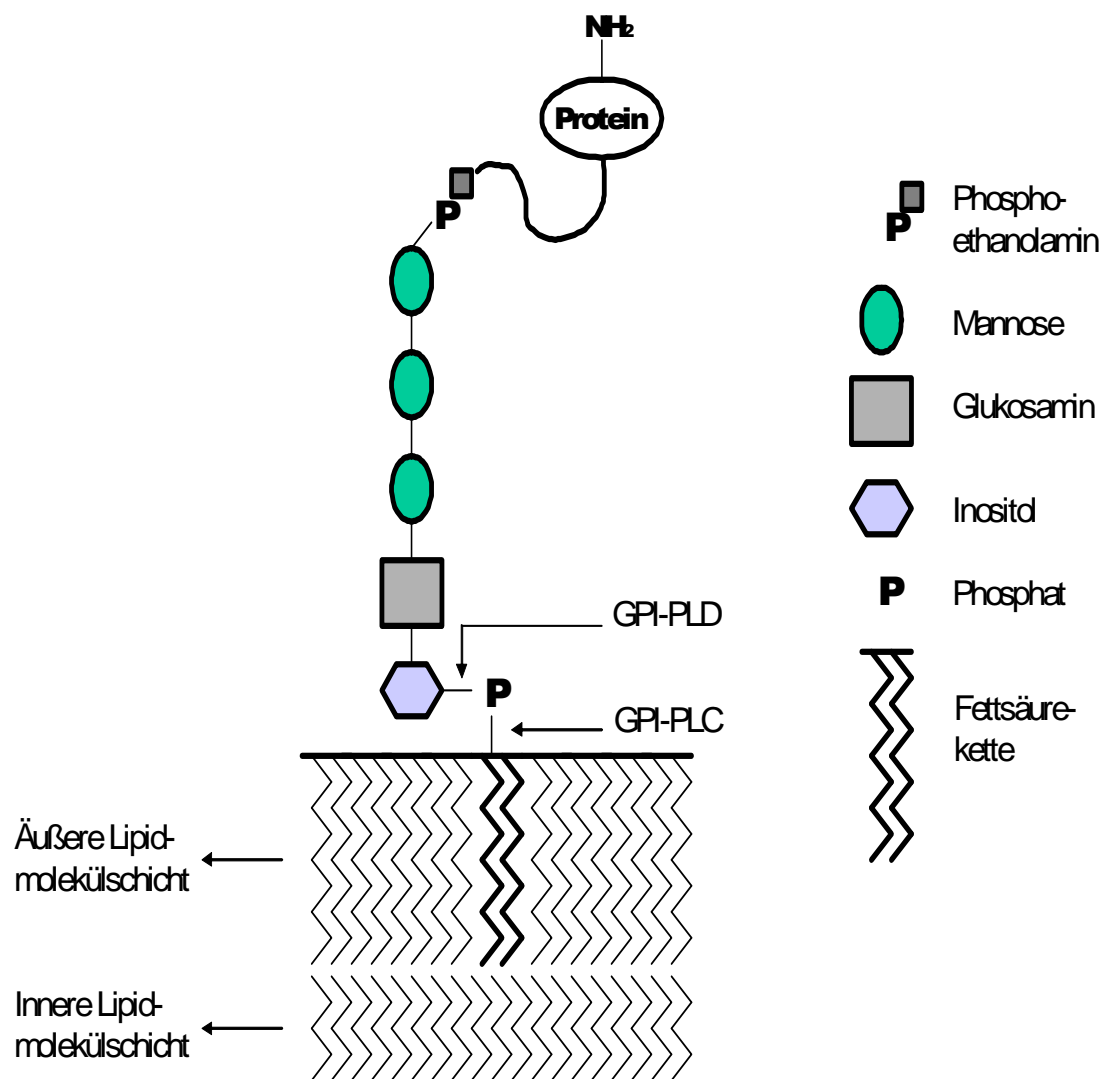
Bei den meisten leukozytären Oberflächenproteinen handelt es sich um transmembrane Moleküle mit einer extrazellulär gelegenen Liganden-Bindungsdomäne, einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Abschnitt. Die Signalübertragung erfolgt größtenteils über zytoplasmatische Moleküle wie Protein-Tyrosin-Kinasen oder G-Proteine, welche mit dem zytoplasmatischen Anteil des transmembranen Proteins in Kontakt stehen. Allerdings gibt es auch eine Gruppe von Oberflächenmolekülen ohne transmembranen und zytoplasmatischen Abschnitt. Diese sind über einen sog. GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden und besitzen keinen direkten Kontakt zu zytoplasmatischen Signalmolekülen. Zu dieser Gruppe der GPI-verankerten Moleküle gehören über 100 verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften (Chatterjee & Mayor, 2001). Während transmembrane Proteine in Lösungen mit Triton-X bei niedrigen Temperaturen eine gute Löslichkeit vorweisen, zeigen GPI-verankerte Proteine eine schlechte Löslichkeit und sammeln sich zusammen mit Glykosphingolipiden, Cholesterol, Protein-Tyrosin-Kinasen und G-Proteinen in der detergentenreichen Phase an (Horejsi et al., 1998).

Die Grundstruktur der GPI-Ankers ist stets gleich (Abb. 2) , Unterschiede finden sich in den verschiedenen Varianten der Seitenkettenmodifikationen. Über die hydrophoben Anteile der Phospholipidkette, welche die äußere Lipidmolekülschicht der Zellmembran durchdringt, ist der GPI-Anker in direktem Kontakt mit der äußeren Zellmembranschicht, während die innere Phospholipidschicht unberührt bleibt (Robinson, 1997). Die Kernstruktur wird durch eine Phosphatidylinositolgruppe gebildet, an welcher ein Glukosamin angeheftet ist, gefolgt von drei Mannose-Molekülen. Die Verbindung zum eigentlichen Protein erfolgt durch eine Phosphoethanolamingruppe.

Die Biosynthese des GPI-Ankers erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum (Chatterjee & Mayor, 2001) und die Anheftung des Proteins geschieht posttranslational (Butikofer et al., 2001). Auf der Membranoberfläche lokalisiert sind die GPI-verankerten Proteine in bestimmten Mikrodomänen. Hierbei handelt es sich um Membranınvaginationen, welche charakterisiert sind durch das Vorkommen von Glykolipiden, Sphingolipiden, Cholesterol sowie Caveolin, weshalb sie auch als

Caveolae bezeichnet werden (Ilangumaran et al., 1996). Zu den zytoplasmatischen Anteilen gehören Protein-Tyrosin-Kinasen und trimere G-Proteine. Das Vorhandensein solcher Mikrodomänen wurde durch in-vitro-Experimente bestätigt, wo nach Zugabe von GPI-verankerten Proteinen zu Zellmembranen diese sich zunächst homogen auf deren Oberfläche verteilten, nach einer Inkubationszeit von 2-3 Std. jedoch punktuell ansammelten (Horejsi et al., 1998). Allerdings gibt es auch Untersuchungen, wonach die Proteine gleichmäßig auf der Membranoberfläche verteilt sind und sich erst nach der Bindung von polyklonalen Antikörpern in den Caveolae anhäufen (Maxfield & Mayor, 1997).

Zahlreichen GPI-verankerten Proteinen konnte die Fähigkeit zur Potozytose nachgewiesen werden (Maxfield & Mayor, 1997), was bedeutet dass sie internalisiert und umgekehrt auch wieder auf die Zelloberfläche befördert werden können. Nach der Internalisierung sind die Proteine intrazellulär in den Endosomen zu finden. Eine weitere Eigenschaft zahlreicher GPI-verankerter Proteine ist ihre Übertragung von einer Zellmembran zur anderen (Ilangumaran et al., 1996).



**Abb. 2:** Grundstruktur des GPI-Ankers (modifiziert nach Chatterjee & Mayer, 2001).

Das Protein ist an ein terminales Phosphoethanolamin-Molekül gekoppelt, welches mit einem Glykan, bestehend aus drei Mannose- und einem Glukosaminmolekül, verbunden ist. An das Glukosamin schließt sich eine Phosphatidylinositolgruppe an. Diese Kernstruktur wird durch Fettsäureketten in der äußeren Lipid-Membranschicht verankert.

### 1.2.2 Funktion des GPI-Ankers

Die Funktion einer GPI-Verankerung von Proteinen in der Zellmembran ist bisher noch nicht eindeutig geklärt worden. Sämtlichen GPI-verankerten Proteinen gemein ist, dass sie sich auf der Zelloberfläche befinden, und dass sie durch den GPI-Anker eine hohe Mobilität aufweisen (Low & Saltiel, 1988). Durch spezifische Phospholipasen können die Proteine von ihrer Verankerung abgetrennt und dadurch abgegeben werden. Dies erfolgt zum einen durch eine spezifische Phospholipase C, zum anderen durch die spezifische Phospholipase D, die in verschiedenen Geweben

und im Plasma vorhanden ist (Low & Saltiel, 1988). Eine schnelle Freisetzung ins Plasma und somit das Vorhandensein einer löslichen Form wurde bereits für zahlreiche GPI-verankerten Proteine nachgewiesen, so z.B. für uPAR (Wilhelm et al., 1999), CD16 (Fossati et al., 2002), CD14 (Durieux et al., 1994) oder auch CD59 (Sloand et al., 1998). Durch eine Freisetzung ins Plasma und durch eine Internalisierung kann ebenfalls die Proteinkonzentration auf der Zelloberfläche kontrolliert werden. Weiterhin finden internalisierte Proteine einen anderen pH-Wert im Zellinneren als auf der Zelloberfläche vor (Maxfield & Mayor, 1997). In den Endosomen befinden sie sich in einem sauren Milieu, welches einen Einfluss auf pH-abhängige Prozesse der Proteine haben kann.

Eine der wichtigsten Eigenschaften von GPI-verankerten Proteinen ist jedoch, ebenso wie bei transmembranen Molekülen, die Fähigkeit zur intrazellulären Signalübertragung. So kann beispielsweise der GPI-verankerte FcγRIIIb-Rezeptor auf Neutrophilen eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirken (Kimberly et al., 1990). Bei zahlreichen anderen GPI-verankerten Proteinen wurde nachgewiesen, dass es nach Bindung eines entsprechenden Antikörpers zu einer Initiierung des oxidativen Bursts, zur Granulozyten-Degranulierung oder auch zur Phosphorylierung und somit zu einer Aktivierung intrazellulärer Protein-Tyrosin-Kinasen kommen kann (Horejsi et al., 1999). Ungeklärt ist allerdings noch der genaue Mechanismus der Signalübertragung von einem ausschließlich extrazellulär gelegenen Protein auf intrazelluläre Bereiche. Eine Möglichkeit wäre die direkte Bindung des GPI-verankerten Proteins an ein transmembranes Molekül. So wurde für CD16b und CD87 nachgewiesen, dass sie nicht-kovalente Komplexe mit dem transmembranen β2-Integrin CD11b/CD18 bilden können (Horejsi et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit wäre ein direkter Kontakt mit zytoplasmatischen Protein-Kinasen. Diese sind über Fettsäuren-Reste mit der inneren Phospholipid-Membranschicht verbunden. Durch eine Antikörper-induzierte Umverteilung und Aggregation der GPI-verankerten Moleküle auf der Zelloberfläche kommt es gleichzeitig zu einer Umverteilung der Protein-Kinasen im Zytoplasma. Dies bewirkt wiederum eine Autophosphorylierung und somit eine Selbstaktivierung der Kinasen. Aufgrund von weiterführenden Untersuchungen wird angenommen, dass die Fettsäuren-Reste der GPI-Anker und der Glykolipide lang genug sind, um die äußere Membranlipidschicht komplett zu durchdringen und dass sie dadurch mit den aliphatischen Ketten der zytoplasmatischen Signal-Moleküle in direktem Kontakt stehen (Horejsi et al., 1999).



### **1.3 NB1 (HNA-2a, CD177)**

#### **1.3.1 Phänotypische Eigenschaften**

Das granulozytäre Antigen NB1 wurde erstmals im Jahre 1971 im Rahmen mehrerer Fälle von neonataler Alloimmun-Neutropenie beschrieben (Lalezari et al., 1971). Hierbei produzierten die Mütter während der Schwangerschaft Antikörper gegen vom Vater vererbte, neutrophile Antigene des Fötus. Diese Antikörper konnten die Plazentaschranke passieren und eine Zerstörung der Neutrophilen des Feten bzw. Neugeborenen bewirken. Später zeigte sich, dass etwa 0,1 % aller Frauen nach einer Schwangerschaft spezifische Antikörper gegen NB1 aufweisen (Clay et al., 1984).

Mit dem Ziel einer einheitlichen Namensgebung, ähnlich wie es bei anderen Zellen der Fall ist, wurde eine neue Nomenklatur für neutrophilen-spezifische Antigene vorgeschlagen. Während „NB1“, wobei das „N“ für „Neutrophil“ steht, der darauffolgende Buchstabe einen spezifischen Genlocus und die anschließende arabische Ziffer das Allel beschreibt (Bux, 2000), noch eine relativ willkürliche Namensgebung darstellt, existiert seit 2002 auch die Bezeichnung „HNA-2a“, was für „Human Neutrophil Antigen“ steht (Stroncek et Bux, 2002). Im Prozess der Kategorisierung leukozytärer antigener Moleküle wurde NB1 auch in das CD-Schema als „CD177“ aufgenommen (Mason et al., 2002).

Bei NB1 handelt es sich um ein Antigen, welches spezifisch für Granulozyten ist (Lalezari et al., 1971; Goldschmeding et al., 1992; Stroncek et al., 1998a). Es wird dominant vererbt und besitzt eine Genfrequenz von 0,9 (Lalezari et al., 1971; Bux et al., 1992b). Eine Besonderheit zeigt sich in der Lokalisation auf der Zelloberfläche. Nicht alle neutrophilen Granulozyten einer Person tragen das Antigen, vielmehr ist es nur auf einer Subpopulation von Neutrophilen zu finden (Clement et al., 1983). Die Größe der NB1-positiven Subpopulation ist dabei sehr variabel und kann zwischen 0–100 % liegen, wobei der Anteil innerhalb einer Person „weitestgehend konstant ist, obwohl signifikante Unterschiede bei einzelnen Individuen vorkommen“ (Goldschmeding et al., 1992). Ca. 3 % der Bevölkerung sind NB1-negativ, bei ihnen ist das Antigen auf keiner Zelle vorhanden (Tab.1). Die durchschnittliche Größe der NB1-positiven Subpopulation liegt etwa zwischen 56–72 % (Goldschmeding et al., 1992; Stroncek et al., 1993d; Han et Um, 1997; Stroncek et al., 1998a), wobei nach einigen Untersuchungen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden konnten (Matsuo et al., 2000), nach anderen allerdings Frauen eine größere

positive Subpopulation aufweisen als Männer (Taniguchi et al., 2002; Caruccio et al., 2003).

Während der myeloischen Zelldifferenzierung ist NB1 erstmals auf Myelozyten zu finden, jedoch nicht auf Myeloblasten, Megakaryozyten oder erythrozytären Vorläuferzellen (Clement et al., 1983; Stroncek et al., 1998a). Dabei entspricht die Größe der NB1-positiven Subpopulation auf den Vorläuferzellen derjenigen der reifen Neutrophilen. Eine Besonderheit zeigt sich bei den neutrophilen Granulozyten aus Nabelschnurblut. Hier liegt die durchschnittliche Größe der NB1-positiven Subpopulation mit 91 % signifikant höher als bei Kindern oder Erwachsenen mit 56 % (Stroncek et al., 1998a). Der Anteil an NB1-negativen Individuen ist bei

<b>NB1-positive Personen</b>	<b>Bevölkerungsgruppe</b>	<b>Quelle</b>
97 %	k.A.	(McCullough et al., 1987)
87 %	Franzosen	(Bierling et al., 1990)
94 %	Deutsche	(Bux et al., 1992b)
99 %	Chinesen	(Lin et al., 1994)
89 %	Japaner	(Ohto, 1989)
86 %	Koreaner	(Han et Um, 1997)
97 %	Weißer	(Ohto, 1989)
97 %	Weißer	(Matsuo et al., 2000)
98 %	Schwarze	(Matsuo et al., 2000)

**Tab.1: Anteil NB1-positiver Personen an der Gesamtbevölkerung bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen**

Neugeborenen mit 3–4 % bereits der gleiche wie bei Erwachsenen (Madyastha et al., 1984). Eine weitere Auffälligkeit hinsichtlich der Expression von NB1 ergab sich in der Betrachtung des Alters der jeweiligen Testgruppen. Während es wiederum Untersuchungen gibt, welche keine Unterschiede in der Expression bezüglich des Alters der Testpersonen aufzeigen (Stroncek et al., 1998a), so zeigte bei einer anderen Untersuchung die Gruppe der Frauen, welche älter als 51 Jahre waren, eine geringere NB1-Expression als die übrigen Frauen (Matsuo et al., 2000). Bei Männern konnte hingegen kein altersbedingter Unterschied festgestellt werden. Darauf folgend wurde auch die NB1-Expression schwangerer Frauen untersucht. Auch hier zeigte

sich ein signifikanter Unterschied: Schwangere besaßen sowohl einen höheren Anteil an NB1-positiven Zellen (78 % zu 69 %), als auch eine höhere Proteinkonzentration pro Zelle (Caruccio et al., 2003; Taniguchi et al., 2004).

Neben der Lokalisation auf der Zellmembran kommt NB1 auch intrazellulär auf der Membran der Sekundär-Granula vor (Stroncek et al., 1990). Dabei hat sich gezeigt, dass nur die Neutrophilen, welche NB1 auf ihrer Oberfläche tragen, auch intrazellulär positiv sind, während umgekehrt alle intrazellulär NB1-negativen Zellen auch auf der Oberfläche kein Protein zu besitzen scheinen (Goldschmeding et al., 1992).

### **1.3.2 Genotypische Eigenschaften**

Das NB1-Gen befindet sich auf Chromosom 19 in der Position 19q13.2 (Kissel et al., 2001). Es besitzt 9 Exons mit insgesamt 1311 Basenpaaren. Diese kodieren 437 Aminosäuren, wobei die ersten 21 Aminosäuren das Signalpeptid darstellen und die restlichen 416 dem eigentlichen Protein dienen. Die 5'- bzw. 3'-UTR-Bereiche bestehen aus 27 bzw. 276 bp. Das zu kodierende Protein besitzt 3 potentielle N-Glykosylierungsstellen, 2 cysteinreiche Domänen mit großer Homologie sowie eine stark hydrophobe C-terminale Sequenz. Die ermittelten Bereiche für die transmembrane und zytoplasmatische Komponente sind mit 21 bzw. 2 Aminosäuren zu kurz, um funktionell von Bedeutung zu sein. Jede der cysteinreichen Domänen besitzt 6 Cysteinreste (Stroncek et al., 2004). Die größte Ähnlichkeit besitzt das NB1-Gen mit den Proteinen der uPAR- / CD59- / Ly-6 snake toxin-Superfamilie. uPAR und NB1 liegen auf dem gleichen Chromosom und sind nur durch ein weiteres Gen voneinander getrennt (Bettinotti et al., 2002).

Fast zur gleichen Zeit wurde die Sequenz eines Glykoproteins ermittelt, welches bei Patienten mit Polycythaemia rubra vera überexprimiert wird (Temerinac et al., 2000). Dieses PRV-1 genannte Gen unterscheidet sich in der cDNA-Sequenz in lediglich 4 Basenpaaren vom NB1-Gen, was auf allen Positionen zu einem Aminosäureaustausch führt (Bettinotti et al., 2002). Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass es sich bei NB1 und PRV-1 um Allele des gleichen Gens handelt (Caruccio et al., 2004; Caruccio et al., 2006). Da Anti-NB1-Antikörper in der Lage sind, sowohl NB1 als auch PRV-1 zu erkennen, geht man weiterhin davon aus, dass es sich bei NB1 und PRV-1 um das gleiche Polypeptid handelt. Im Gegensatz zum mRNA-Level wird das Protein bei PRV-Patienten im Vergleich zu Gesunden nicht überexprimiert (Klippel et al., 2002). Zusätzlich existiert bei etwa 60 % aller Personen

ein Pseudogen, welches homolog zu NB1 im Bereich von Exon 4 bis Exon 9 ist, jedoch in entgegengesetzter Richtung wie das NB1-Gen codiert wird (Bettinotti et al., 2002; Klippel et al., 2002; Dittmar et al., 2003).

Auf der Suche nach der Ursache für die individuell unterschiedliche Größe der NB1-positiven Subpopulation wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen einzelne Single-Nukleotid-Polymorphismen auf eine mögliche genetische Komponente hin untersucht. Dabei fiel besonders Position 7 (G  $\leftrightarrow$  C) auf, welche innerhalb des Signalpeptids liegt. Hier konnten mehrere Arbeitsgruppen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Subpopulationsgröße zwischen Personen mit Genotyp „G/G“ und solchen mit Genotyp „C/C“ feststellen (Wolff et al., 2003; Caruccio et al., 2004). Ein solch signifikanter Unterschied existiert zusätzlich noch bei den SNP's an Pos. 751 (A  $\leftrightarrow$  C) und Pos. 1042 (G  $\leftrightarrow$  A) (Wolff et al., 2003). Kommt es an mehreren Stellen zu einem Aminosäureaustausch, kann dies zu einer Veränderung der Tertiärstruktur und der Antigenität führen. Vergleicht man die relative NB1-mRNA Menge zwischen NB1-positiven und NB1-negativen Zellen, so zeigt sich, dass die Zellen der positiven Subpopulation eine im Mittel etwa 28-fach höhere Menge aufweisen als die NB1-defiziente Gruppe (Wolff et al., 2003). Dabei sind deren Werte insgesamt so niedrig, dass man von einem völligem Fehlen der NB1-mRNA Transkription in diesen Zellen ausgehen kann.

Eine der Ursachen für das völlige Fehlen von NB1-Glykoproteinen auf der Zelloberfläche ist ein Splicing-Defekt (Bux, 2000; Kissel, 2002). In diesen Fällen wurden in der vorhandenen mRNA Insertionen von Intron-Sequenzen gefunden, was zur Bildung von Stop-Codons geführt hat. Dem Protein fehlten somit mögliche geeignete Abschnitte zur Verlinkung an einen GPI-Anker.

### 1.3.3 Struktur und biochemische Eigenschaften

NB1 gehört zur Ly-6-Gen-Superfamilie. Diese Proteine sind charakterisiert durch das Vorhandensein von cysteinreichen Domänen mit jeweils acht bis zehn Cysteinresten und einer Länge von 70–100 Aminosäuren. Innerhalb der Superfamilie können zwei Subfamilien unterschieden werden: Zum einen Proteine mit einer GPI-Verankerung, zum anderen sekretorische Proteine ohne GPI-Anker (Stroncek et al., 2004). Während NB1 jeweils sechs Cysteinreste pro Domäne aufweist, besitzen die anderen Mitglieder entweder acht oder zehn Cysteinreste je Domäne. Auch in der Anzahl der Domänen weist NB1 eine Besonderheit auf. Die meisten Ly-6 Proteine haben nur eine cysteinreiche Domäne, NB1 hingegen besitzt zwei und uPAR drei solcher Domänen (Plesner et al., 1997). uPAR ist auch gleichzeitig das Molekül, welches zu NB1 die größte Homologie aufweist. Insgesamt jedoch ist die Homologie innerhalb der Familie mit 20-30 % nur gering. Auch die Funktionen der einzelnen Proteine decken ein weites Spektrum ab, sind allerdings insgesamt betrachtet noch nicht ausreichend erforscht.

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper sowie von Alloantikörpern wurde ein Molekulargewicht für NB1 durch SDS-PAGE von 58-64 kDa unter nicht reduzierten Bedingungen ermittelt (Stroncek et al., 1990; Skubitz et al., 1991). Eine Veränderung des Molekulargewichts unter reduzierten Bedingungen (52-57 kDa) spricht für das Vorhandensein von Disulfidbrücken. Eine exaktere Untersuchung mittels Massenspektrometrie ergab ein Molekulargewicht von 50,556 kDa mit drei Asparagin-gebundenen Glykan-Resten (Kissel et al., 2001). Unter reduzierten Bedingungen ist eine Bindung bislang etablierter monoklonaler Anti-NB1-Antikörper nicht möglich, daher scheint die Antigenität von NB1 sehr stark von dessen Tertiärstruktur abzuhängen (Stroncek et al., 1990; Kissel et al., 2001). Unabhängig ist das NB1-Epitop allerdings von den angehängten Zucker-Molekülen. So konnten nach einer Zuckerabspaltung durch N-Glykosidase die Epitope der monoklonalen Antikörper TAG 4 und 7D8 weiterhin erkannt werden.

Bei Untersuchungen zur Oberflächenexpression konnte gezeigt werden, dass verschiedene monoklonale Antikörper gegen NB1 die gleiche Subpopulation an Granulozyten erkennen (Stroncek et al., 1990; Goldschmeding et al., 1992). Daher existieren auf dem NB1-Glykoprotein mindestens 2 verschiedene Epitope und der Unterschied zwischen der positiven und der negativen Subpopulation kann nicht nur in Veränderungen innerhalb eines Epitops zu finden sein. Ausgeschlossen als

Ursache für die Existenz der verschiedenen Subpopulationen wurden ebenfalls rein morphologische Unterschiede (Stroncek et al., 1998b).

1982 wurde mit NB2 ein potentiell Allel von NB1 beschrieben (Lalezari et al., 1982). Der Anteil NB2-tragender Individuen an der Gesamtbevölkerung ist mit 68 % wesentlich geringer als bei NB1 (McCullough et al., 1987). Später konnte jedoch in einer Untersuchung gezeigt werden, dass polyklonale Anti-NB1-Antikörper nicht in der Lage waren, das NB2 tragende Molekül zu identifizieren (Stroncek et al., 1993a). Daher ist man heute der Ansicht, dass es sich bei diesem Glykoprotein nicht um ein Allel von NB1 handelt, wobei genauere Untersuchungen noch ausstehen.

Die Verankerung des NB1-Moleküls erfolgt über einen GPI-Anker (Skubitz et al., 1991; Goldschmeding et al., 1992). Durch die GPI-spezifische Phospholipase C können die NB1-Proteine von der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten abgespalten werden. Dies wurde bestätigt durch die Untersuchung von Personen mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie. Hier kommt es durch eine Genmutation zur fehlerhaften Ausbildung des GPI-Ankers. Bei diesen Personen ist die mittlere Größe der NB1-positiven Subpopulation mit 33 % wesentlich geringer als bei Personen ohne Gendefekt mit 64 % (Goldschmeding et al., 1992).

Werden NB1-positive Granulozyten mit einem humanen Allo-Anti-NB1-Antikörper bei 4°C inkubiert, beobachtet man eine Bindung der Ak nur an den membranständigen Proteinen. Diese membranständigen NB1-Moleküle waren dabei nicht gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt, sondern sie lagen konzentriert in wenigen Gebieten vor (Goldschmeding et al., 1992). Standen zwei neutrophile Granulozyten dabei in direktem Kontakt miteinander, wurden die NB1-Proteine zusätzlich an den Spitzen von Zellausläufern bzw. in den korrespondierenden Invaginationen vorgefunden. Werden die Zellen anschließend für eine gewisse Zeit bei 30°C inkubiert, finden sich anschließend die zuvor membranständigen Moleküle in zytoplasmatischen Vakuolen wieder und es kommt zu einer Abnahme der Proteinkonzentration auf der Zelloberfläche. Erfolgt die Inkubation bei 30°C vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper, fällt die Abnahme der Proteinkonzentration nur sehr gering aus.

### 1.3.4 Funktion von NB1

Obwohl das NB1-Antigen schon relativ lange bekannt ist und es aufgrund seiner heterogenen Expression auf vielseitiges Interesse stößt, ist seine eigentliche Funktion bisher nur unzureichend erforscht. Seine Verwandtschaft zu anderen Mitgliedern der Ly-6-Gen-Superfamilie erlaubt keine Aussage, da diese Proteine unterschiedlichste Funktionen innehaben.

Protein	Expression	Cysteinreiche Domänen	Eigenschaften / Funktion
CD59	Erythrozyten	1	
PSCA	Prostata	1	Marker Prostatakrebs, Steigerung der Zellteilung von Prostatazellen
E-48 (LY6D)	Keratinozyten	1	Überexprimierung beim Plattenepithelkarzinom
RIG-E	Promyelozytische Leukämie	1	Expression durch Tretionin (=ATRA)
LY6H	Lymphoblastische Leukämie, Gehirn	1	
LYGK	Keratinozyten	1	Überexprimierung beim Squamösen Zell-Karzinom
GML		1	Expression durch Suppressor Gen p53
SP-10	Spermien, Hoden	1	abnormales RNA splicing
SAMP14	Spermatozoen	1	
NB1	Neutrophile Granulozyten	2	?
UPAR	Neutrophile Granulozyten, Monozyten	3	Rezeptor d. Urokinase Typ Plasminogen Aktivator

**Tab. 2:** GPI-verankerte Proteine der Ly-6-Gen-Superfamilie (modifiziert nach Stroncek et al., 2004).

Das Protein mit der größten strukturellen Ähnlichkeit zu NB1 ist uPAR (CD87). Dieses stand in zahlreichen funktionellen Untersuchungen im Mittelpunkt und es ist heute bekannt, dass es vielseitige Zellfunktionen besitzt. Auf der Ebene der Leukozytenadhäsion spielt es eine Rolle durch Interaktionen mit  $\beta$ 1- oder  $\beta$ 2-Integrinen (Plesner et al., 1997). Ob auch NB1 eine solche Funktion aufweist ist bislang unbekannt. Allerdings existiert eine Untersuchung über die Unterschiede in der Adhäsion und Chemotaxis NB1-positiver und NB1-negativer Neutrophiler. So wurde gezeigt, dass bei unstimulierten Neutrophilen die Adhäsion von NB1-negativen Zellen an Endothelzellen stärker ist als bei denen, die das Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Kein Unterschied in der Adhäsion zeigte sich jedoch in den Fällen, wo die Granulozyten zuvor mit fMLP oder C5a stimuliert wurden. In keinem Fall kam es zu Unterschieden in der Chemotaxis zwischen NB1-positiven und NB1-negativen Zellen (Stroncek et al., 1994).

Werden neutrophile Granulozyten durch verschiedene Stoffe stimuliert bzw. aktiviert, führt dies zu Veränderungen in deren NB1-Oberflächenexpression. So erhöht sich bei in vitro-Experimenten die NB1-Oberflächenkonzentration nach einer Stimulation der Zellen durch fMLP (Skubitz et al., 1991; Goldschmeding et al., 1992), während dabei gleichzeitig der Anteil NB1-positiver Zellen unverändert bleibt. Der gleiche Effekt kann in vivo durch die Gabe von G-CSF erreicht werden (Göhring et al., 2004). Erfolgt bei in vivo-Experimenten die G-CSF-Gabe über mehrere Tage, kommt es zum einen zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration auf der Oberfläche, zum anderen erhöht sich aber auch ab dem 6. Tag der Anteil der NB1-positiven Zellen (Stroncek et al., 1998b). Auch hat die Gabe von G-CSF Einfluss auf den mRNA-Gehalt NB1-positiver Zellen. So wird dieser ebenfalls nach einer Stimulation signifikant erhöht (Wolff et al., 2003; Passamonti et al., 2004), woraus eine hohe Assoziation zwischen der Anzahl der mRNA-Kopien und der NB1-Oberflächenkonzentration postuliert wird (Göhring et al., 2004). Eine Assoziation zwischen der Erhöhung des NB1-mRNA Levels und einer erhöhten Neutrophilenproduktion wird in der Literatur ebenfalls angegeben (Stroncek et al., 2004). Auf andere GPI-verankerte Proteine kann G-CSF auch den gegenteiligen Effekt haben. So wurde gezeigt, dass durch eine einmalige Gabe von G-CSF die Expression von CD16 zunächst leicht ansteigt, die durch die G-CSF-Gabe neu gebildeten Granulozyten jedoch eine geringere Expression aufweisen (Kerst et al., 1993).



Verschiedene Untersuchungen deuten auf eine Beeinflussung der granulozytären Abwehrfunktion hin, allerdings sind die Befunde uneinheitlich. So konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von monoklonalen Antikörpern an NB1 die Effizienz der Abtötung von *Candida albicans* abnimmt. Während die Phagozytose-Aktivität der Zellen dabei unbeeinflusst bleibt, kommt es zu einer Reduktion der Sauerstoffradikalbildung (Bartunkova et al., 1997). Eine Steigerung der Sauerstoffradikalbildung durch Anti-NB1-Antikörper wurde dagegen von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet (Bux et al., 1993a; Nardi et al., 2001). Weiterführend wurde auch eine Beeinflussung der Phagozytoseaktivität gezeigt: Durch NB1-spezifische Alloantisera bzw. durch monoklonale Antikörper konnte eine Hemmung der Phagozytose erreicht werden (Bux et al., 1993a).

Des Weiteren erweisen sich Personen mit vollständiger NB1-Defizienz als klinisch gesund, und ihre neutrophilen Granulozyten zeigen keine funktionellen Veränderungen (Stroncek et al., 2004). Aufgrund der Hochregulation von NB1 nach einer Stimulation durch fMLP sowie der Möglichkeit der Verlagerung ins Zellinnere nach einer, durch Antikörper bedingten, Kreuzvernetzung der Proteine, wird eine Rezeptorfunktion für NB1 angenommen (Goldschmeding et al., 1992).

Eine weitere interessante Beobachtung wurde im Wachstum von mit CD177 transfizierten Zellen gemacht. Hier fiel auf, dass CHO-CD177-Zellen eine schnellere Wachstumsrate aufweisen als untransfizierte CHO-Zellen (Mnjoyan et al., 2005). Dieser Wachstumsunterschied wurde noch deutlicher, wenn das Kulturmedium kein FCS enthält.

### **1.3.5 Die Rolle von NB1 bei verschiedenen Erkrankungen**

Verschiedene Erkrankungen sind bisher beschrieben worden, bei deren Entstehung das NB1-Antigen bzw. Anti-NB1-Antikörper eine Rolle spielen. Im Vordergrund stehen dabei Immunneutropenien, insbesondere die Neonatale Alloimmun-Neutropenie (NAIN) (Lalezari et al., 1971; Bux et al., 1992b; Felix & Calhoun, 2000; Maheshwari et al., 2002). Hierbei bilden NB1-defiziente Mütter Antikörper gegen die NB1-positiven Granulozyten des Fötus (s. Kap. 1.3.1). Durch die darauffolgende Zerstörung der Zellen kann dies zu einer Immunschwäche mit anschließender erhöhter Gefahr einer Infektion des Neugeborenen führen. Allerdings kommt es nach etwa 3–28 Wochen, im Mittel nach 11 Wochen, zu einer spontanen Remission (Bux et al., 1992b), da die maternalen Antikörper immer nur in einer begrenzten Zahl

vorliegen. Über eine Immunneutropenie verursacht durch Anti-NB1-Antikörper wird bei einer Transplantation von Knochenmark berichtet (Stroncek et al., 1993b). Ein weiterer Fall ist im Rahmen einer unverwandten Stammzelltransplantation aufgetreten (Pocock et al., 2001).

Neben den Neonatalen Autoimmun-Neutropenien spielt NB1 auch eine Rolle bei Transfusionszwischenfällen. Von großer Bedeutung ist hierbei die Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI). TRALI gilt in den USA und Großbritannien als häufigste Todesursache im Rahmen transfusionsbedingter Zwischenfälle (Holness et al., 2004). Die Inzidenz für TRALI beträgt ca. 1:625–1:2500 je transfundiertem Patient und etwa 5-26 % aller Fälle enden tödlich (Bux, 2002; Bux, 2005). Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch das Auftreten von akuter Atemnot, einer Hypoxämie sowie eines beidseitigen, nicht-kardiogenen Lungenödems, das typischerweise innerhalb der ersten 6 Std. nach einer Bluttransfusion auftritt. Dabei gilt TRALI als eine bisher unterdiagnostizierte Erkrankung, von der Symptomatik ähnelt es dem ARDS. Für das Auftreten einer klinischen TRALI-Symptomatik scheint neben der auslösenden Komponente auch eine Vorerkrankung der betreffenden Person notwendig zu sein (Silliman et al., 1998). Die auslösenden Komponenten lassen sich in 2 Gruppen einteilen:

Zur ersten, seltener vorkommenden Gruppe gehören nicht-immunogene Substanzen, d.h. granulozyten-aktivierende Substanzen in transfundierten Erythrozyten- oder Thrombozytenpräparaten, wie beispielweise biologisch aktive Lipide (Silliman et al., 1997; Silliman et al., 2003).

Zur zweiten Gruppe gehören immunogene Substanzen. So konnten Anti-HLA-Antikörper oder auch Anti-NB1-Antikörper im Blut des Empfängers bzw. im Spenderblut nachgewiesen werden (Bux et al., 1996; Leger et al., 1999; Fung et al., 2003; Sachs et Bux, 2003).

Nicht eindeutig geklärt ist bisher der genaue Pathomechanismus für die Entstehung des Lungenödems. Möglicherweise spielen dabei eine durch Antikörper bedingte Leukozytenagglutination im Kapillargebiet oder eine durch Antikörper verursachte Aktivierung der Neutrophilen mit anschließender Endothelschädigung eine Rolle.

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

1. Etablierung und Validierung eines ELISA-Testsystems zur quantitativen Bestimmung von NB1
2. Untersuchungen zur unterschiedlichen Expression von NB1 auf der Zelloberfläche und in der gesamten Zelle
3. Nachweis einer löslichen Form von NB1 aus dem Plasma mittels verschiedener biochemischer Untersuchungsmethoden
4. Untersuchungen zur Funktion von NB1 einschließlich der Charakterisierung eines Counterrezeptors

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

7D8 (Anti-NB1)	Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen
7D8 (Überstand)	Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen
7D8 (biotinmarkiert)	Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen
Anti-E-Selektin/FITC	Fa. Serotec, Oxford, England
Gi 18 (Anti-PECAM-1)	Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen
MEM166 (Anti-NB1)	Fa. Serotec
PECAM 1.1 (Anti-PECAM-1)	Dr. P. Newman, Blood Research Institute, Milwaukee, USA
PECAM 1.2 (Anti-PECAM-1)	Dr. P. Newman, Blood Research Institute, Milwaukee, USA
Polyklonaler Rabbit-Anti-Mouse/FITC	Fa. DakoCytomation, Hamburg
Polyklonaler Rabbit-Anti-Human/FITC	Fa. DakoCytomation
Humanes Anti-NB1 wurde uns freundlicherweise von Prof. Jürgen Bux, DRK-Blutspendedienst, Hagen, zur Verfügung gestellt.	

#### 2.1.2 Proteine

E-Selektin	Fa. Serotec
hPECAM-1	Fa. Serotec

Das Protein PRV1 wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Heike Pahl (Institut für Experimentelle Anästhesie, Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.

PECAM-Fc erhielten wir von Peter J. Newman, Blood Research Institute, The Blood Center of Southeastern Wisconsin, Milwaukee.

Das AB-Serum stammt aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen. Es handelt sich hierbei um gepooltes Humanplasma der Blutgruppe AB.

### 2.1.3 Zellen und Zellkulturmedien

7D8-Hybridomzellen: 400 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10 ml 50x HT Supplement, 100 ml FCS, 2,5 ml P/S

CHO-NB1: 447,5 ml MEM, 50 ml FCS, 2,5 ml P/S,  
400 mg Geneticin

CHO-K1: 447,5 ml MEM, 50 ml FCS, 2,5 ml P/S

CHO-PECAM1: 447,5 ml MEM, 50 ml FCS, 2,5 ml P/S,  
400 mg Zeocin

Endothelzellen: 200 ml MCDB 131 (Invitrogen) 22,73 ml FCS, 2,3 ml P/S, 2,3 ml Glutamin, 909 µl ECGS, 1 mg EGF

Die Zellreihen CHO-K1, CHO-NB1 und CHO-PECAM-1 wurden uns freundlicherweise von Thomas Schmitt-Wöll, Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg zur Verfügung gestellt. Die CHO-NB1-Zellen exprimieren dabei native NB1-Proteine, d.h. NB1 mit einem GPI-Anker.

### 2.1.4 Lösungen und Puffer

- Ammoniumchlorid: 8,3 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g  $\text{KHCO}_3$ , 0,037 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   
Triplex, pH = 7,4
- APS-Puffer: 312,5 mg APS, 25 ml Aqua dest.
- BCECF: 50 µg in 100 µl DMSO
- Coating-buffer: 1,5 g Natriumcarbonat, 2,93 g Natriumhydrogencarbonat, 0,2 g Natriumazid,  
1000 ml Aqua dest., pH = 9,6
- Dextran: 20 g Dextran, 400 ml PBS, pH = 7,4
- Einfriermedium: 80 % des jeweiligen Zellkulturmediums,  
20 % DMSO
- HBSS : 10 % HBSS (10x), 90 % Aqua dest.
- Lysispuffer: 4,9 ml IPB-Puffer, 100 ml PMSF (100mM)
- Paraformaldehyd: 800 mg PFA, 20 ml PBS, 600 µl 3 M NaOH,  
600 µl 3M HCl, pH = 7,4
- PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ): 10 % PBS (10x), 90 % Aqua dest.
- Substratlösung: 3 ml Aqua dest., 1 Tabl. OPD, 1,25 µl  $\text{H}_2\text{O}_2$
- Lösungen für die Kopplung des mAk 7D8 an CNBr-aktivierte Sepharose

#### 4B:

- Kopplungspuffer: 0,1 M Natriumhydrogencarbonat, 2 M NaCl, pH = 8,3
- Blockierungspuffer: 0,1 M Tris-HCl, pH = 8,0
- Zyklus-Waschpuffer 4,0: 0,1 M Natriumacetat-trihydrat, 0,5 M NaCl, pH = 4,0
- Zyklus-Waschpuffer 8,0: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH = 8,0
- Lösungen für Immunaффinitätschromatographie:
  - Lysepuffer: 230 µl 20 mM TBS, 7,5 µl Protease-Inhibitor-Cocktail, 10 µl EDTA (5 %), 1 % Triton X-100
  - Waschpuffer A: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 0,1 % Triton X-100, pH = 8,0
  - Säurepuffer: 500 mM NaCl, 200 mM Essigsäure, 0,1 Triton X-100, pH = 2,8
  - Basenpuffer: 0,05 M Diethylamin, 0,1 % Triton X-100, pH = 11,5
  - Bindungspuffer (10fach): 60 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2 mol), 100 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,0
- Lösungen für IgG-Aufreinigung von Plasmaproben:
  - Neutralisationspuffer : 12,11 g TRIS-HCl in 90 ml Aqua dest., pH = 9,0
  - Elutionspuffer (10fach): 7,51 g Glycin in 90 ml Aqua dest., pH = 2,7
- Lösungen für Phasen-Separation mit Triton X-114:
  - Tritonpuffer: 10 mM Tris, 20 mM EDTA, 154 mM NaCl, 2 % Triton X-114, pH = 8,0
  - Saccharosepuffer: 175 mM Saccharose, 10 mM Tris, 514 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4 % Triton X-114, pH = 7,4
- Lösungen für Endothelzellisolierung:
  - Collagenase-Lösung: 12,5 mg Collagenase in 50 ml HBS<sup>+/+</sup>-Puffer
  - HBS-Stock-Lösung (11fach): 88 g NaCl, 3,3 g KCL, 26,2 g HEPES, 22 g Glukose, 1 l Aqua dest., pH = 7,58
  - HBS-Puffer (1fach) : 100 ml HBS-Stock-Lsg., 1 l Aqua dest.
  - HBS<sup>+/+</sup>-Puffer: 100 ml HBS-Stock-Lsg., 1 l Aqua dest., 15 mM

CaCl<sub>2</sub>, 15 mM MgCl<sub>2</sub>

- Lösungen für Immunpräzipitation:
  - IPB-Puffer : 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH = 7,4
  - Sample-Buffer (non reduced): 950 µl Aqua dest, 1 ml Lösung C, 1 ml Lösung D, 1 ml Glycerin, 100 µl Bromphenolblau, aufteilen in 400 µl Aliquots und bei 4°C lagern. Unmittelbar vor Gebrauch 100 µl Aqua dest. hinzugeben
  
- Lösungen für SDS-PAGE:
  - Lösung B: 36,3 g Tris, 100 ml Aqua dest., pH = 8,8
  - Lösung C: 10 g SDS, 100 ml Aqua dest.,
  - Lösung D: 3 g Tris, 50 ml Aqua dest., pH = 6,8
  - Trenngel (10 %): 2,49 ml Aqua dest., 1,594 ml Rotiphorese Gel 30, 581 µl Lösung B, 46,9 µl Lösung C, 6,25 µl Temed, 156,25 µl APS
  - Sammelgel: 1,75 ml Aqua dest., 0,5 ml Rotiphorese Gel 30, 312,5 µl Lösung D, 25 µl Lösung C, 7,5 µl Temed, 93,75 µl APS
  - Sample-Buffer (non reduced): 950 µl Aqua dest, 1 ml Lösung C, 1 ml Lösung D, 1 ml Glycerin, 100 µl Bromphenolblau, aufteilen in 400 µl Aliquots und bei 4°C lagern. Unmittelbar vor Gebrauch 100 µl Aqua dest. hinzugeben
  - Laufpuffer: 100 ml Rotiphorese® SDS-PAGE, 900 ml Aqua dest.
  
- Lösungen für Immunoblot:
  - Puffer A: 36,3 g Tris, 800 ml Aqua dest., 200 ml Methanol, pH = 10,4
  - Puffer B: 3,03 g Tris, 800 ml Aqua dest., 200 ml Methanol, pH = 10,4
  - Puffer C: 5,2 g εAminocaprinsäure, 800 ml Aqua dest., 200 ml Methanol
  - Blockierungslösung: 1,5 g BSA, 100 ml ECL-Waschpuffer
  - Konjugationslösung: 3,3 µl Streptavidin-HRP, 9,997 ml Blockierungslösung

- ECL-Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH = 7,4
- Lösungen für die Silberfärbung:
  - Silberfärbungslösung A: 0,69 M Sulfosalicylsäure, 3,6 M Trichloressigsäure
  - Silberfärbungslösung B: 1,23 M Methanol, 0,18 M Essigsäure
  - Silberfärbungslösung C: 10 % Glutaraldehyd, 90 % Aqua dest.
  - Silberfärbungslösung D: 19 mM NaOH, 4,7 mM AgNO<sub>3</sub>, 12 mM NH<sub>4</sub>OH
  - Silberfärbungslösung E: 2,45 M Methanol, 0,24 mM Zitronensäure, 0,018 % Formaldehyd
- Lösungen für Adhäsionstest mit Fluoreszenzmarkierung:
  - Färbelösung: 0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol, 79,5 % Aqua dest.
  - Fixierungslösung: 50 % Methanol, 50 % Aceton
  - Messlösung: 40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 50 % Aqua dest.

### 2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Herkunft
Accutase	Fa. PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Aceton	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid	Fa. Merck
Ammoniumhydroxid	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
BCECF	Fa. Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Butanol	Fa. Merck
CaCl <sub>2</sub>	Fa. Merck
Collagenase	Fa. Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, USA
Dextran	Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Diethylamin	Fa. Merck
DMSO	Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
DPI	Fa. Sigma, St. Louis, USA
ECGS	Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland
ECL+-Reagenz	Fa. Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
EGF	Fa. PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland



EDTA	Fa. Merck
Eaminocaprinsäure	Fa. Merck
Essigsäure	Fa. Merck
FCS	Fa. PAN Biotech
Ficoll-Paque	Fa. Amersham Biosciences
FMLP	Fa. Sigma
Formaldehyd	Fa. Merck
GCSF	Fa. Endogen, Boston, USA
Geneticin	Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glutamin	Fa. PAA Laboratories, Linz, Österreich
Glutaraldehyd	Fa. Merck
Glycerin	Fa. Merck
HCl	Fa. Merck
Hi Trap™ Protein G HP	Fa. Amersham Biosciences
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fa. Merck
Isopropanol	Fa. Merck
KCl	Fa. Merck
Kristall-Violett	Fa. Fluka
Lipofectamin™ 2000 Reagent	Fa. Invitrogen
MgCl <sub>2</sub>	Fa. Merck
MEM	Fa. GIBCO BRL, Grand Island, USA
Methanol	Fa. Fluka
NaCl	Fa. Roth
NaOH	Fa. Merck
Natriumacetat-trihydrat	Fa. Merck
Natriumazid	Fa. Merck
Natriumcarbonat	Fa. Merck
Natriumhydrogencarbonat	Fa. Merck
NHS-LC-Biotin	Fa. Pierce, Rockford, USA
Östrogen	Fa. Sigma
OPD	Fa. Dako
Opti-MEM®	Fa. Invitrogen
PBS	Fa. Gibco
PFA	Fa. Merck
Prestained Protein Ladder	Fa. Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Fa. Sigma
Protein-G beads	Fa. Gerbu
P/S	Fa. PAN Biotech
Rotiphorese® Gel 30	Fa. Roth
Rotiphorese® SDS-PAGE	Fa. Roth
RPMI 1640	Fa. PAA
Schwefelsäure	Fa. Sigma
SDS	Fa. ICN, Eschwege, Deutschland
Sepharose 4B	Fa. Amersham Biosciences
Sepharose-Säule	Fa. Pharmacia

Silbernitrat	Fa. Sigma
Streptavidin-HRP	Fa. Amersham Biosciences
Sucrose	Fa. Merck
Sulfosalicylsäure	Fa. Merck
TBS	Fa. Gibco
Temed	Fa. Gibco
TNF $\alpha$	Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA
Trichloressigsäure	Fa. Merck
Tris	Fa. Roth
Tris-HCl	Fa. Roth
Triton X-100, X-114	Fa. Sigma
Zeocin	Fa. Invitrogen
Zitronensäure	Fa. Merck

### **Vorgefertigte Systeme (Kits)**

BCA Protein Assay Reagent Kit®	Fa. Pierce
Bursttest (Phagoburst®)	Fa. ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Deutschland
CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit	Fa. Dynal Biotech, Hamburg
QIFIKIT®	Fa. Dako

### **Verbrauchsmaterialien**

3-Wege-Hahn	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Einfrierampullen	Fa. NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Eppendorfgefäß 1,8 ml	Fa. Roth
Falcon™-Röhrchen	Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Filterpapier	Fa. Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Flachbodenplatte 96-well	Fa. Greiner-Bio-One
Flachbodenplatte 24-well	Fa. Greiner-Bio-One
Glaspipetten 5, 10, 20 ml	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Kabelbinder	Fa. Cimco

Latexhandschuhe	Fa. Roth
μ-clear-Platte	Fa. Greiner-Bio-One
Mullkompressen	Fa. Fuhrmann, Neunkirchen, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	Fa. Amersham Biosciences
Parafilm©	Fa. American Can Company, New York, USA
Pasteurpipetten	Fa. Kahlensee, Gießen, Deutschland
Petrischalen	Fa. Falcon, Franklin Lakes, USA
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Fa. Greiner-Bio-One
Pipettenspitzen (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen steril (0,5- 10 l, 10-100)	Fa. Greiner-Bio-One
Polyröhrchen	Fa. Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Röntgenfilm	Fa. Agfa, München, Deutschland
Rundbodenplatte, 96-well	Fa. Greiner-Bio-One
Skalpelle, steril	Fa. Feather Industries, LTD, Tokio, Japan
Slide-A-Lyzer® 10K Dialysis Cassettes	Fa. Pierce
Schüttler Duomax 1030	Fa. Heidolph, Kelkheim, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen	Fa. Greiner-Bio-One
Vacutainer Blutröhrchen	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Wägepapier	Fa. Schleicher & Schnell
Zellkulturflaschen mit Filter (250 ml)	Fa. Greiner-Bio-One
Zellkulturflaschen ohne Filter (250 ml)	Fa. Greiner-Bio-One

## Geräte & Instrumente

Analysenwaage AE 100	Fa. Mettler, Zürich, Schweiz
Analysenwaage PJ 6000	Fa. Mettler
Arterienklemme	Fa. Helwig
Durchflusszytometer FACSCalibur	Fa. Becton & Dickinson
Dynal Magnetic Particle Separator	Fa. Dynal Biotech, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenz-Lesegerät FLX 800	Fa. Bio-Tek Instruments, Vermont, USA
Gefrierschrank (-20°C)	Fa. Bosch, Stuttgart, Deutschland Fa. Electrolux, Stockholm, Schweden
Gefrierschrank (-80°C)	Fa. Bosch
Knopfkanüle	Fa. Helwig
Kühlschrank	Fa. Electrolux
Lichtmikroskop Labovert	Fa. Leitz, Wetzlar, Gießen
Lichtmikroskop	Fa. Leitz
Magnetrührer, Typ RCO	Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen, Deutschland
Mehrkanalpipette	Fa. Eppendorf
Multipipette	Fa. Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Fa. Optiklabor
PH-Meter	Fa. WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Plattenphotometer Sunrise	Fa. Tecan, Salzburg, Deutschland
Plattenzentrifuge, Labofuge GL	Fa. Heraeus Christ, Hanau, Deutschland
Plattenzentrifuge, Universal 32	Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Rotator	Fa. Fisher-Scientific, Ingolstadt, Deutschland
SDS-PAGE-Halteapparatur	Fa. Keutz, Reiskirchen, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Fa. Heraeus Christ
Tischzentrifuge Biofuge A	Fa. Heraeus Christ
Tischzentrifuge Mikro 20	Fa. Hettich

Ultrazentrifuge Discovery 100	Fa. Sorvall
Vortexer, Reax 2000	Fa. Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Wärmeschrank	Fa. Ehret, Freiburg, Deutschland
Wasserbad, SW 21C	Fa. Julabo, Seelbach, Deutschland
Zellcounter	Fa. Sysmex Digitana, Hamburg, Deutschland
Zellkulturschrank Hera Cell	Fa. Heraeus Christ
Zentrifuge Rotixa/A	Fa. Hettich
Zentrifuge Rotina 35	Fa. Hettich

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probensammlung und Probenaufbereitung

#### 2.2.1.1 Isolierung von Granulozyten aus EDTA-Blut

Die Isolierung von Granulozyten erfolgte modifiziert nach Boyum (Boyum, 1968). Hierfür wurden zu 10 ml EDTA-Blut jeweils 2,5 ml einer 5 %-igen Dextranlösung hinzugegeben. Nach kurzzeitigem Schwenken erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Zur Beschleunigung der Sedimentation der Erythrozyten wurden die Blutröhrchen schräg gestellt. Während der Inkubation wurden in jeweils 2 Poly-Röhrchen für 10 ml EDTA-Blut je 2,5 ml einer Ficoll-Paque Lösung vorgelegt, auf welche anschließend der leukozytenhaltige Überstand mittels einer Pasteur-Pipette vorsichtig geschichtet wurde. Nach einer Zentrifugation bei 1.200 UpM für 30 min bei RT befanden sich im Pellet der Probe die Granulozyten zusammen mit noch übrig gebliebenen Erythrozyten, in der darauffolgenden Interphase die Lymphozyten und Monozyten. Oberhalb der Interphase lag der plasmahaltige Überstand und die Thrombozyten. Die Interphase und der Überstand wurden abgesaugt, und auf das Pellet wurden 2 ml einer Ammoniumchloridlösung gegeben und zwei- bis dreimal resuspendiert. Durch eine Inkubation von 5 min auf Eis wurden dadurch die noch übrig gebliebenen Erythrozyten lysiert. Die Reste der Erythrozyten wurden durch 2-maliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min bei 800 Upm entfernt.

Da Granulozyten bereits durch Kontakt mit der Röhrchenwand aktiviert werden können, erfolgten sowohl die Isolierung als auch die Durchführung von Experimenten mit Granulozyten stets am Tag der Blutentnahme.

#### **2.2.1.2 Fixierung von Granulozyten**

Die aus 10 ml EDTA-Blut isolierten Granulozyten wurden in 1,5 ml PBS gegeben. Nach der Zugabe von 0,5 ml einer 4 %igen PFA-Lösung erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Dunkelheit und RT mit anschließendem Waschen mit PBS für 5 min bei 800 Upm. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet, je nach Größe, in 1-2 ml PBS resuspendiert.

#### **2.2.1.3 Herstellung von Granulozytenlysat**

Da in den folgenden Versuchen quantitative Aussagen eine entscheidende Rolle spielten, wurden für die Herstellung von Granulozytenlysat stets jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen je Probe verwendet. Die Granulozyten wurden in ein 1,8ml Eppendorfgefäß gegeben und durch Zentrifugation bei 12.000 Upm für 3 min vom PBS getrennt. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Zellpellet wurden 250 µl Lysepuffer gegeben. Dies wurde für 30 min bei einer Temperatur von 4°C auf einem Rüttler inkubiert. Nachfolgend kam es wiederum zu einer Zentrifugation bei 13.000 Upm für 30 min bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues 1,8 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von –80°C gelagert.

#### **2.2.1.4 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration von Granulozytenlysat**

Die Bestimmung des Proteingehalts von Granulozytenlysat erfolgte mittels dem BCA Protein Assay Reagent Kit. Für die Erstellung einer Standardkurve wurden hierbei 9 verschiedene Verdünnungen (0-2.000 µg/ml) von bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet. 50 µl von jeder Verdünnungsstufe und jeder Probe wurden zusammen mit 1 ml „BCA Working Reagent“ für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Kühlphase von 10 min bei RT erfolgte die Konzentrationsbestimmung am Photometer.

#### **2.2.1.5 Gewinnung von Plasma**

EDTA-Blut wurde frühestens 2 Std. nach der venösen Blutentnahme für 10 min bei 1400 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in 1,8 ml Eppendorfgefäße überführt und erneut für 3 min bei 10.000 g zentrifugiert. Nach der Überführung des Plasmas in neue Eppendorfgefäße wurde dieses bei –20°C gelagert.

#### **2.2.1.6 Kopplung des mAk 7D8 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B**

Die Kopplung von 7D8 an Sepharose 4B erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. 3 g Sepharose 4B wurden in 1mM HCl gelöst. 10 ml der gelösten Substanz wurden 15 min mit 600 ml 1mM HCl gewaschen. 25 mg des gereinigten Antikörpers (8,3 mg/ml) wurden 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Dem Überstand wurden 3 ml doppelkonzentrierter Kopplungspuffer zugesetzt, und nach der Kontrolle des pH-Werts noch einmal 8 ml Kopplungspuffer. Diese Lösung wurde nun mit 10 ml der Sepharose-Lösung (Verhältnis 2,5 mg mAk/1 ml Sepharose) gemischt und zur Kopplung des Antikörpers an die Sepharose über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden überschüssige Liganden entfernt und das Gel mit 100 ml Kopplungspuffer gewaschen. Durch Zugabe von 35 ml Blockierungspuffer und Inkubation für 2 Std. bei RT wurden noch freie reaktive Gruppen der Sepharose blockiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen alternierend mit jeweils 45 ml Zyklus-Waschpuffer 4,0 und 8,0. Nach Befüllen einer Sepharose-Säule mit dem 7D8-Sepharose-Komplex wurde dieser mit 30 ml Kopplungspuffer/0,01 Natriumazid gewaschen. Anschließend wurde die Säule verschlossen und bei 4°C aufbewahrt. Für die spätere Durchführung von Kontrollversuchen wurde unter analogen Bedingungen eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit Maus-IgG gekoppelt (11,2 mg Sepharose/5 mg gequollene Sepharose).

#### **2.2.1.7 Isolierung von NB1 durch Immunaффinitätschromatographie**

Für die Isolierung von NB1 aus Granulozytenlysat durch Immunaффinitätschromatographie wurde zunächst eine Grobreinigung und anschließend eine Hauptreinigung bei 4°C durchgeführt. Als Ligand für das NB1-Antigen diente immobilisierter mAk 7D8. Jeweils  $1 \times 10^{10}$  Granulozyten wurden in 100 ml Lysepuffer lysiert und somit das NB1-Antigen in Lösung gebracht. Zur Entfernung störender Matrixkomponenten wurde das Granulozytenlysat durch Zentrifugation bei 13.000 g und 4 °C für 30 min vorgereinigt. Der Überstand wurde abgenommen und zur weiteren Isolierung verwendet. Die mit Maus-IgG sowie mit dem mAk 7D8 gekoppelten Sepharose 4B Säulen wurden in Serie geschaltet und mit Hilfe einer Pumpe mit 100 ml Waschpuffer A bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,7 ml/min gespült. Zunächst wurde das Granulozytenlysat zur Vorreinigung auf die

Maus-IgG-Säule gegeben. Anschließend passierte das nun vorgereinigte Granulozytenlysat die mit 7D8 beladene Säule in einer Laufgeschwindigkeit von 0,12 ml/min. Nachfolgend wurden die beiden Säulen voneinander getrennt und die mit mAk 7D8 gekoppelte Säule wurde mit 150 ml Waschpuffer A (0,6 ml/min) und 15 ml NaCl Lösung (0,7 ml/min) gewaschen. Die Elution des an den mAk 7D8 gebundenen Antigens erfolgte manuell sowohl im sauren als auch im basischen Milieu. Die erste Elution erfolgte mit 50 ml Säurepuffer mit 0,5 ml/min. Die Eluate wurden in Fraktionen mit jeweils 4 ml Volumen aufgefangen und augenblicklich mit je 0,96 ml 1 M Tris-HCl (pH = 9,5) neutralisiert. Die Säule selbst wurde mit 40 ml 0,1 M Tris-HCl (pH = 7,8) und 10 ml NaCl (0,9 ml/min) gewaschen. Die zweite Elution erfolgte mit 100 ml Basenpuffer wiederum in 4 ml-Fraktionen, welche sofort mit jeweils 2 ml 1 M Tris-HCl (pH = 6,8) neutralisiert wurden. Die Eluate wurden zunächst mittels Silberfärbung auf das Vorhandensein von NB1 und dessen Reinheit, anschließend durch Immunoblot zur Bestätigung der Spezifität von NB1 überprüft.

#### **2.2.1.8 IgG-Aufreinigung von Plasmaproben**

Zur Vorbereitung wurde 1 ml IgG-Säule (Hi Trap™ Protein G HP) mit 10 ml Bindungspuffer (1fach) gewaschen. 6 ml Plasma wurden mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,12 ml/min über die IgG-Säule laufen gelassen. Nach einer Spülung mit 10 ml Bindungspuffer (1fach) wurden 210 µl Neutralisationspuffer in ein 50 ml Plastikröhrchen vorgelegt. Die Säule wurde mit 5 ml Elutionspuffer (1fach) eluiert, wobei der Durchfluss mit dem vorgelegten Neutralisationspuffer aufgefangen wurde. Die Elution wurde anschließend ein weiteres Mal wiederholt. Zur Aufreinigung des Eluats wurde dieses in eine Dialyse-Cassette (Slide-A-Lyzer 10K) gegeben und über PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) dialysiert. Am folgenden Tag wurde das Eluat über einen Amicon Zentrifugenfilter durch eine Zentrifugation bei 5.000 g für 30 min bei 4°C eingeeengt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch (siehe Kap. 2.2.1.4).

### **2.2.2 Phänotypische Untersuchungen**

#### **2.2.2.1 Quantitative Durchflusszytometrie**

##### Prinzip:

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, verschiedene Zellen anhand ihrer Größe und Granularität zu unterscheiden und sie anhand bestimmter Merkmale



(Antigene) zu charakterisieren. Hierbei fließen die Zellen einzeln hintereinander durch eine Flusszelle und werden von der Seite mit einem Laserlicht angestrahlt. Es entsteht das Streulicht, welches an zwei verschiedenen Punkten gemessen wird. Das Vorwärtsstreulicht („Forward Scatter“) gibt Auskunft über die Größe der Zelle (je größer das Vorwärtsstreulicht, desto größer die Zelle). Das Seitwärtsstreulicht („Side Scatter“) erlaubt eine Aussage über die Granularität (je größer das Seitwärtsstreulicht, desto mehr Granula besitzt die Zelle). Weiterhin können Antigene auf der Zelloberfläche mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern, welche beim Auftreffen des Laserlichts auf die Zelle aufleuchten, erkannt werden. Somit lässt sich das Vorhandensein eines bestimmten Antigens auf der Zelloberfläche ermitteln.

Bei der quantitativen Durchflusszytometrie kann zusätzlich die Aussage getroffen werden, wieviel Antigen pro Zelle exprimiert wird. Hierzu benötigt man einen Standard mit einer definierten Menge an Antigen. Zur Bestimmung der NB1-Konzentration auf der Granulozytenoberfläche verwendeten wir das QIFIKIT (Fa. Dako). Es enthält zum einen sogenannte Set-Up-Beads, welche aus unmarkierten Beads und Beads mit einer sehr hohen Anzahl an Mausantikörper bestehen. Zum anderen beinhaltet es die Calibration-Beads, diese bestehen aus fünf verschiedenen Gruppen mit jeweils bekannter Antikörperdichte. Während die Set-Up-Beads zur Verstärkereinstellung des FL1-Kanals dienen, erhält man durch die Calibration-Beads eine Standardkurve, mit deren Hilfe anschließend die Antigenkonzentration auf der Zelloberfläche bestimmt wird.

#### Vorgehen:

Je Ansatz wurden  $10^5$  Granulozyten in eine Vertiefung einer 96-well-Rundbodenplatte gegeben. Nach Hinzugabe von 25 µl 7D8-Überstand bzw. 20 µl Maus-IgG (0,02 µg/µl) als Negativkontrolle wurden die Ansätze für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit je 200 µl PBS/BSA 0,2% pro Vertiefung für jeweils 30 sec bei 1.200 UpM wurden zu jedem Ansatz 40 µl eines FITC-markierten „Rabbit-Anti-Mouse-IgG“ (1:35 mit PBS verdünnt) hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min bei RT und Dunkelheit und anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 30 sec bei 1.200 UpM, wurden die Zellpellets in je 350 µl PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung der Proben erfolgte unverzüglich, spätestens jedoch 30 min nach der Überführung.

Zur Bestimmung der Antigenkonzentration auf der Zelloberfläche wurden je 100 µl der Set-Up-Beads und der Calibration-Beads in je ein FACS-Röhrchen gegeben und mit 3 ml PBS 5 min bei 1.400 UpM gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 100 µl des FITC-markierten Rabbit-Anti-Mouse-IgG (1:35 mit PBS verdünnt) und eine Inkubation von 30 min bei RT und Dunkelheit. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit jeweils 3 ml PBS für 5 min bei 1.400 UpM und anschließender Zugabe von 350 µl PBS erfolgte die Messung unmittelbar vor den eigentlichen Proben.

#### Auswertung:

In der Durchflusszytometrie wurden die untersuchten Granulozyten in zwei Subpopulationen unterteilt: Zum einen in eine NB1-positive, zum anderen in eine NB1-negative Subpopulation, welche im allgemeinen deutlich voneinander unterschieden werden konnten. Der Anteil der NB1-positiven Population (%) ergab sich durch folgende Berechnung: Differenz zwischen der Gesamtzellzahl und der Zellen, deren relative Fluoreszenz-Intensität denen der Negativkontrolle (Maus IgG) entsprach, dividiert durch die Gesamtzellzahl und multipliziert mit dem Faktor 100. Die mittlere Anzahl der Oberflächenmoleküle pro Zelle wurde ermittelt durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität mit der Standardkurve der Calibration-Beads.

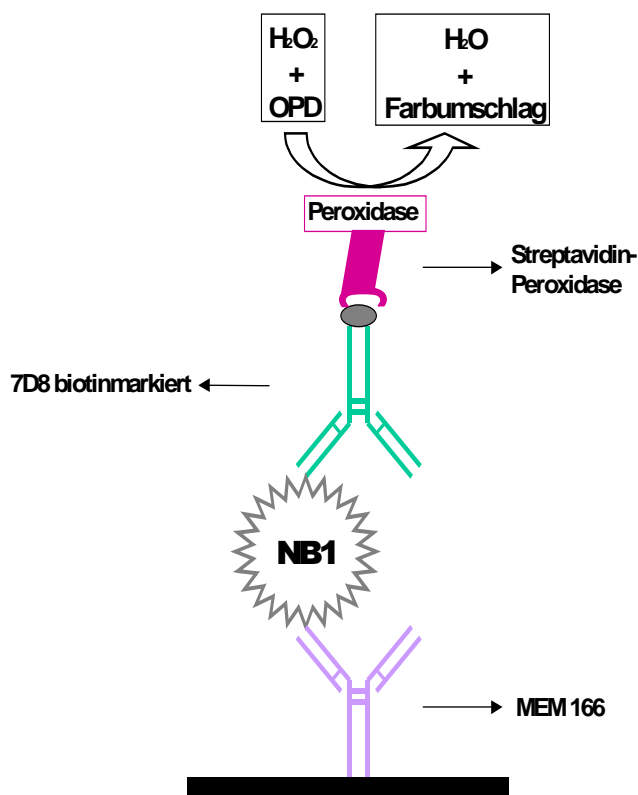
#### **2.2.2.2 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)**

##### Prinzip:

Durch den Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay können Antigenmengen quantitativ bestimmt werden. Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte ELISA basiert auf einer indirekten Methode, der sogenannten „Sandwich“-Technik. Hierbei werden 2 verschiedene Antikörper eingesetzt: Zum einen der „coating-Antikörper“, welcher irreversibel an der Plastikoberfläche adhäriert und an diesem spezifisch das zu detektierende Antigen bindet, zum anderen der biotinmarkierte „Detektionsantikörper“, welcher nun an das bereits gebundene Antigen bindet. Durch Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes bindet das Streptavidin an das Biotin des Detektionsantikörpers. Als Substrat für die Peroxidase dient  $H_2O_2$ , welches, nun zum Radikal gespalten, in einem Chromogen (in diesem Fall OPD) durch Oxidation einen Farbumschlag bewirkt, dessen optische Dichte direkt proportional zur Antigenmenge ist.

### Vorgehen:

Als primärer Antikörper („coating-Ak“) diente MEM166 (Abb. 3). Pro well einer 96-Loch-Flachbodenplatte wurden 5 µg MEM166 (verdünnt mittels coating-buffer auf 5 µg/100 µl) aufgetragen und über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit einer 0,02 %igen PBS/BSA-Lösung (jeweils 200 µl pro Vertiefung) wurden zur Blockierung der noch freien Bindungsstellen 100 µl PBS/BSA 2 % aufgetragen und 30 min bei 4°C inkubiert.



**Abb. 3: Prinzip des angewendeten Sandwich-ELISA**

Anschließend wurden die Platten ausgeklopft und jeweils 100 µl der entsprechenden Probe, welche je nach Material in unterschiedliche Konzentrationen mit PBS verdünnt wurde (Granulozytenlysat jeweils die Menge, welche 150 µg Gesamtprotein entspricht, Plasma  $\frac{1}{2}$ , Urin  $\frac{1}{4}$ ), eingesetzt. Es folgte eine Inkubation von 1 Std. bei RT und nachfolgendem dreimaligen Waschen mit PBS/BSA 0,02 %. Als sekundärer Antikörper („Detektions-Ak“) diente biotin-markierter 7D8. 2 µl 7D8 (4,5 mg/ml) wurden in 9 ml PBS/BSA 0,2 % verdünnt, jeweils zu 100 µl pro Vertiefung eingesetzt

und 1 Std. bei RT inkubiert. Darauf erfolgte wiederum ein dreimaliges Waschen mit PBS/BSA 0,02 %. 2 µl Streptavidin-HRP wurden in 10 ml PBS/BSA 0,2 % verdünnt, wovon nun 100 µl in jede Vertiefung gegeben wurden. Nach einer Inkubation von 1 Std. bei 37°C und wiederum dreimaligem Waschen kam es nun zur Zugabe von 100 µl/Vertiefung der Substratlösung. Die nun stattfindende Reaktion wurde nach 1 Std. bei 37°C mit jeweils 50 µl einer Schwefelsäure-Lösung (mol/l) abgestoppt. Die optische Dichte wurde am Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 492 nm ermittelt.

#### **2.2.2.3 Erstellung einer Standardkurve zur Bestimmung der NB1-Konzentration**

Für die Bestimmung der Konzentration von NB1 im Plasma bzw. in Granulozytenlysat wurde mit Hilfe des PRV1-Proteins eine Standardkurve erstellt. Durch entsprechende Verdünnung mit PBS wurden sieben verschiedene Konzentrationen (1,5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5 ng/ml; 7,5 ng/ml; 10 ng/ml; 15 ng/ml; 20 ng/ml) eingesetzt und deren optische Dichte im ELISA bestimmt. Pro Testansatz wurde jede Verdünnung dreifach getestet und der ELISA wurde insgesamt dreimal wiederholt. Durch Auftragen der ermittelten optische Dichte (Y-Achse) gegen die jeweilige PRV1-Konzentration (X-Achse) konnte eine Regressionsgerade erstellt werden, mit deren Hilfe die optische Dichte der Proben in eine Proteinkonzentration umgerechnet werden konnte. Durch eine Verdünnung der Proben (Plasma  $\frac{1}{2}$ , Granulozytenlysat  $\frac{3}{20}$ , Urin  $\frac{1}{4}$ ) wurde sichergestellt, dass deren Absorption sich im linearen Messbereich befindet.

#### **2.2.2.4 Depletion von Plasma-NB1 durch Sepharose 4B**

Für die Depletion von NB1 aus Plasma wurden zunächst 100 µl CNBr-aktivierter Sepharose 4B (mit mAk 7D8 gekoppelt) mit 500 µl IPB-Puffer für 5 min bei 2.000 UpM zwei mal gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurden 200 µl Plasma hinzugegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 2.000 UpM für 5 min wurde der Überstand erneut auf 100 µl Sepharose-7D8 gegeben und für 1 Std. bei RT auf einem Rotator inkubiert. Dieser Vorgang wurde anschließend ein weiteres Mal wiederholt. Das depletierte Plasma wurde auf seinen NB1-Gehalt mittels ELISA überprüft und mit der optischen Dichte des undepletierten Plasmas verglichen. Zur Kontrolle erfolgte die Depletion mit Sepharose ohne mAk 7D8, als Negativkontrolle diente jeweils PBS pur. Die

Detektion des durch die Sepharose absorbierten NB1 erfolgte mittels Immunpräzipitation.

#### **2.2.2.5 Ultrazentrifugation**

Für die Ultrazentrifugation von Plasma wurden jeweils 6 ml Plasma in ein Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und exakt gegeneinander ausgewogen (maximale Differenz 3 mg). Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 160.000 g bei 4°C für 1 Std. Überstand und Pellet wurden voneinander getrennt und die Pellets wurden, für eine Gleichsetzung der Anteilsverhältnisse, in 6 ml PBS gelöst. Die Auswertung der jeweiligen Anteile an NB1 erfolgte durch den oben beschriebenen ELISA (siehe Kapitel 2.2.2.2).

#### **2.2.2.6 Phasen-Separation mit Triton X-114**

Lösungen mit Triton X-114 bilden bei einer Temperatur von 0°C eine einzelne homogene Phase (Bordier, 1981). Werden solche Lösungen jedoch auf Temperaturen von mind. 20°C erwärmt, kommt es zur Auftrennung dieser Phase in einen wässrigen und einen detergentenreichen Anteil. Das Maß der Separation steigt dabei mit ansteigender Temperatur. Zur Auftrennung der wässrigen und detergentenreichen Phase wurden jeweils 2 ml Plasma bzw. 500 µl Granulozytenlysat 1:1 mit vorgekühlten Tritonpuffer versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben, zur Entfernung unlöslichen Materials, für 1 Std bei 4°C und 17.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf die gleiche Menge an Sucrosepuffer geschichtet. Es folgten 2 Inkubationen für je 30 min, zunächst bei 4°C, anschließend bei 37°C im Wasserbad. Die endgültige Trennung der Phasen wurde durch eine Zentrifugation bei 2.000 g für 10 min bei 20°C erreicht. Für eine Gleichsetzung der Anteilsverhältnisse wurde die detergentenreiche Phase mittels PBS auf das Volumen der wässrigen Phase angepasst. Die Bestimmung des Anteils an NB1 in der jeweiligen Phase erfolgte mittels ELISA (siehe Kapitel 2.2.2.2).

## **2.2.3 Zellkulturarbeiten**

### **2.2.3.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten**

Die Zellkulturen wurden auf Petrischalen von 10 cm Durchmesser im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden, je nach Wachstumsrate, jeden zweiten bis dritten Tag geteilt. Dafür wurde das jeweilige Medium abgenommen und der Zellrasen mit 10 ml NaCl gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von der Plastikoberfläche wurden diese mit 1-2 ml Accutase für etwa 5 min inkubiert. Die Wirkung der Accutase wurde durch Hinzugabe von 10 ml serumhaltigen Medium aufgehoben. Die abgelösten Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min bei 1.200 UpM und RT) pelletiert, durch Lösen in Medium entsprechend verdünnt und mit insgesamt 10 ml Medium auf eine neue Petrischale überführt.

### **2.2.3.2 Auftauen von Zellen**

Die eingefrorenen Zellen wurden aus dem Stickstofftank genommen und unmittelbar nach dem Auftauen in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt. Nach langsamer Zugabe von 8 ml Medium erfolgte eine Zentrifugation von 5 min bei 1.200 UpM. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 10 ml Medium gelöst und in eine Petrischale gegeben.

### **2.2.3.3 Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden von der Petrischale mittels Accutase abgelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 900 µl Zellkulturmedium gelöst, in eine 1,8 ml Einfrierampulle überführt und auf Eis gegeben. Nach der Zugabe von 900 µl Einfriermedium wurde die Einfrierampulle geschwenkt und für 1 Std. bei –20°C gelagert. Darauf folgte die Lagerung bei –80°C über Nacht und schließlich die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

### **2.2.3.4 Transfektion von CHO-Zellen**

Am Tag vor der Transfektion wurden pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte  $2 \times 10^5$  CHO-Zellen ausgesät, so dass deren Boden am Tag der Transfektion zu etwa 90 % zugewachsen war. Für jede Vertiefung wurden jeweils 1 µg DNA und 2 µl Lipofecatmine™ 2.000 Reagent in je 50 µl Opti-MEM pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vorsichtig miteinander gemischt und

für weitere 20 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die Vertiefungen zweifach mit PBS gewaschen und jeweils 500 µl Zellkulturmedium ohne Antibiotikum zugesetzt. In jede Vertiefung wurden 100 µl des DNA-Lipofectamine-Gemisches pipettiert und für 24 Std. im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 2 ml des jeweiligen Zellkulturmediums hinzugefügt.

#### **2.2.3.5 Kultivierung von 7D8 Hybridomzellen**

Die 7D8 Hybridomzellen stammen von einer Immunisierung von BALB/c Mäusen mit gereinigtem NB1-Antigen (Stroncek et al., 1996). Sie wurden im Labor von Dr. D.F. Stroncek, Minneapolis, USA sowie Organon Teknika/Biotechnology Research Institute, Rockville, USA etabliert und unserem Labor für weiterführende Untersuchungen von Dr. Stroncek freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Hybridomzellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturbrutschrank in 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen. Abhängig von Wachstumsrate und Dichte wurden die Zellen jeden 2. bis 3. Tag geteilt und mit 75 ml Medium versorgt.

#### **2.2.3.6 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Zellrasen wie oben beschrieben mit Accutase von der Petrischale abgelöst. 10 µl Zelllösung wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl mittels folgender Formel ermittelt: Anzahl der Zellen in 4 großen Quadraten x 2,5 = Zellzahl/µl.

#### **2.2.3.7 Zellselektion mit CELLection™ Pan Mouse IgG Kit**

Für die Zellselektion von CHO-NB1 Zellen wurden 25 µl Dynabeads gut resuspendiert und in 1 ml PBS/BSA 0,1 % gelöst. Mit Hilfe des Dynal Magnetic Particle Separator wurden die beads separiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die beads schließlich in 25 µl PBS/BSA 1 % aufgenommen. Es folgte eine Inkubation mit 0,5 µg mAK 7D8 für 30 min und RT auf einem Rotator. Nach 4-maliger Separation der beads wurden diese in 25 µl PBS/BSA 0,1 % aufgenommen. 10<sup>7</sup> CHO-NB1 Zellen wurden in 0,5 ml PBS/BSA 1 % aufgenommen und den beads zugesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT auf einem Rotator wurde das beads-Zellgemisch zweimal separiert und anschließend in 200 µl PBS/BSA 1 % aufgenommen. Zur Abtrennung der beads von den CHO-NB1 Zellen wurden 15 µl

DNAse hinzugegeben und dieses 15 min bei RT inkubiert. Durch den Magnetic Separator wurden schließlich die beads pelletiert und der zellhaltige Überstand wurde in eine neue Petrischale überführt. Die Kontrolle der Separation erfolgte durch die oben beschriebene Quantitative Durchflusszytometrie.

#### **2.2.3.8 Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnüren**

Für jede Nabelschnur wurde zunächst eine Petrischale mit 10 ml NaCl/Gelatine 0,2 % beschichtet und 2 Std. bei RT inkubiert. Mit Hilfe einer Mullkompressen wurde die Nabelschnur oberflächlich gesäubert. Etwa 1 cm der Nabelschnur wurde durch ein Skalpell abgetrennt und eine Knopfkanüle in die Vene eingeführt, welche mittels Kabelbinder fixiert wurde. Die Vene wurde nun 2 x mit 50 ml HBS-Puffer gespült und das andere Ende mit einer Arterienklemme verschlossen. Durch einen 3-Wege-Hahn, welcher auf die Knopfkanüle gesetzt wurde, wurde die Vene mit Collagenase-Lösung prall gefüllt und durch den 3-Wege-Hahn „verschlossen“. Die Nabelschnur wurde nun für 20 min im Zellkulturbrutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend von einer Seite zur anderen leicht massiert. Durch eine Spülung der Nabelschnur mit 30 ml HBS-Puffer wurde das Collagenase-Endothelzellen-Gemisch aus der Nabelschnurvene in ein mit 1 ml FCS gefülltes 50 ml Plastikröhrchen überführt und anschließend 5 min bei 1.200 UpM zentrifugiert. In dieser Zeit erfolgte das Absaugen der Gelatinelösung aus der vorgesehenen Petrischale. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde verworfen, das Endothelzellpellet in 10 ml HUVEC-Medium resuspendiert und in die Petrischale überführt. Die Inkubation erfolgte im Zellkulturbrutschrank. Der Endothelzellrasen wurde ca. alle 3-4 Tage mit Accutase von der Petrischale abgelöst und auf neue Petrischalen verteilt. Die Endothelzellen wurden so bis zur 5. Passage für Experimente verwendet.

### **2.2.4 Proteinanalytische Methoden**

#### **2.2.4.1 Herstellung biotinmarkierten Endothelzelllysats**

Für die Herstellung biotinmarkierten Endothelzelllysats wurden Endothelzellen so lange in einer Petrischale kultiviert, bis der Boden zu mindestens 80 % zugewachsen war. Zunächst wurden die Endothelzellen mit 100 ng TNF $\alpha$  für 4 Std. im Zellkulturbrutschrank stimuliert. Anschließend wurde das Medium aus der Petrischale abgesaugt und die Platte dreimal mit PBS gewaschen. 2 ml 5mM NHS-LC-Biotin



wurden auf die Endothelzellen pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Petrischale zwei- bis dreimal leicht geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Petrischale wiederum dreimal mit PBS gewaschen und 1 ml Lysispuffer hinzugegeben. Nach 5 min wurde die lysierten Endothelzellen mit Hilfe des Stempels einer 1 ml-Einwegspritze abgeschabt, in ein 1,8 ml Eppendorfgefäß überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Eppendorfgefäß zwei- bis dreimal für wenige Sekunden gevortext. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 13.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Überführung des Überstands in neues 1,8 ml Eppendorfgefäß wurde dieser entweder sofort weiterverwendet oder bis zum späteren Gebrauch bei einer Temperatur von –80°C eingefroren.

#### **2.2.4.2 Immunpräzipitation**

##### Vorreinigung des Endothelzellenlysats

100 µl Protein-G beads wurden in ein 1,8 ml Eppendorfgefäß gegeben und zusammen mit 500 µl IPB-Puffer 1 min bei 2.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet wurden 600 µl Endothelzellenlysats, 20 µl AB-Serum und 80 µl BSA (100 mg gelöst in 1 ml Aqua dest.) gegeben und kurz aufgeschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT auf einem Rotator und einer anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 2.000 UpM wurde der Überstand in ein neues 1,8 ml Eppendorfgefäß überführt. Wiederum wurden 100 µl Protein-G beads und 20 µl AB-Serum hinzugefügt und für 30 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Es folgte eine zweimalige Zentrifugation, zunächst für 1 min 2.000 UpM, anschließend für 1 min bei 13.000 UpM. Der Überstand wurde in neues 1,8 ml Eppendorfgefäß überführt und je nach Bedarf anschließend sofort weiterverwendet oder bei –80°C tiefgefroren.

##### Vorinkubation der Protein-G beads

Je Ansatz wurden 100 µl Protein-G beads zusammen mit 500 µl IPB-Puffer für 1 min bei 2.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und auf jedes Pellet wurden 100 µl IPB-Puffer gegeben. Zu Ansatz 1 und 2 wurden jeweils 2 µg mAk 7D8 gegeben, zu Ansatz 3 2 µg hPECAM-Fc. Die drei Ansätze wurden für 1 Std. bei RT auf einem Rotator inkubiert und anschließend mit je 500 µl IPB-Puffer für 1 min bei 2.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu jedem Pellet wurden 100 µl IPB-Puffer gegeben. Ansatz 1 wurde nun mit 100 µl BSA (3 %), Ansatz 2 mit 4

µg NB1 und Ansatz 3 ohne weiteren Zusatz für 1 Std. bei RT auf einem Rotator inkubiert. Nach der Zugabe von jeweils 500 µl IPB-Puffer erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 2.000 UpM. Der Überstand wurde anschließend verworfen.

Auf jeden Portein-G beads Ansatz wurden 300 µl vorgereinigtes und biotinmarkiertes Endothelzellenlysat pipettiert und über Nacht auf einem Rotator bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst zweimal eine Zentrifugation mit jeweils 500 µl IPB-Puffer für 1 min bei 2.000 UpM. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden zu jedem Ansatz 100 µl zweifacher Sample-Buffer (non reduced) gegeben und für 5 min bei 99°C denaturiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 13.000 UpM wurde der jeweilige Überstand in ein neues 1,8 ml Eppendorfgefäß überführt und je nach Bedarf bei –80°C eingefroren oder mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.

#### **2.2.4.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Nach der Reinigung der 2 Glasplatten mit Isopropanol wurden zwischen diesen auf der rechten und linken Seite je 1 Steg bündig angelegt und in eine vertikale Halteapparatur eingespannt. Nach Überprüfung der Dichtheit des Systems wurden vorsichtig 3 ml Trenngel (10 %) luftblasenfrei eingegossen und mit Butanol komplett überschichtet. Nach 45 min Polymerisation wurde das Butanol abgesaugt und mit Aqua dest. nachgespült. Nach dem Einfügen des Kammes wurde das Sammelgel vorsichtig bis zum oberen Rand eingegossen bis es nach ca. 45 min auspolymerisierte. Nach dem Entfernen des Kammes wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer gefüllt. In die Ausparungen wurden nun 25 µl Probenansatz, 5 µl Standard (Fermentas) oder 25 µl Sample-Buffer (non reduced) gegeben. Nach Anlegen der Elektroden wurden die Proben zunächst für ca. 15-20 min bei 120 V (Sammellauf), anschließend für ca. 60-90 min bei 200 V (Trennlauf) aufgetrennt.

#### **2.2.4.4 Immunoblot (Western Blot)**

Nach dem SDS-PAGE wurde der Sammelgelanteil abgeschnitten und das verbliebene Trenngel zusammen mit der Nitrocellulose-Membran für ca. 5 min in Puffer A inkubiert. Jeweils 3 Teile Filterpapier (ca. 9 x 8 cm) wurden kurz in Puffer A, B bzw. C eingelegt. Nun wurden die einzelnen Bestandteile des Blotsandwichs nach folgender Reihenfolge (von unten nach oben) auf den Blotkasten geschichtet: 3 Filter

aus Puffer A, 3 Filter aus Puffer B, Nitrocellulose-Membran, Gel, 3 Filter aus Puffer C. Nach Auflegen des Deckels wurde nun für 45 min bei 45 mA und 10 Watt geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran in eine Glasschale überführt und 1 Std. mit 10 ml Blockierungslösung bei RT blockiert. Die Blockierungslösung wurde abgesaugt und die Membran 30 min bei RT auf einem Schüttler mit 10 ml Konjugationslösung inkubiert. In den Fällen ohne vorherige Immunpräzipitation wurde die Membran nach der Blockierung für 1 Std. bei RT mit 10 ml des entsprechenden Antikörpers (2,5 µg/ml) und für 45 min mit 10 ml RAM-HRP (1:100.000) inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran insgesamt 7 Mal mit je 10 ml ECL-Waschlösung gewaschen: Dreimal für jeweils 15 sec, einmal für 15 min und dreimal für je 5 min. Abschließend erfolgte eine Inkubation mit 5 ml ECL+plus-Reagenz für 5 min und die Exposition auf einem Röntgenfilm mit einer Dauer von 2 sec bis 10 min.

#### **2.2.4.5 Rehybridisierung**

Die Nitrocellulose-Membran wurde 5 min mit 10 ml Aqua dest. in einer Glasschale unter Schütteln gewaschen. Das Aqua dest. wurde vorsichtig abgeschüttet und die Membran 30 min bei RT mit 10 ml 0,4 M NaOH inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit Aqua dest. für 5 min erfolgte eine Blockierung mit Blockierungslösung für 1 Std. bei RT auf einem Schüttler. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 10 ml eines entsprechenden mAk (2,5 µg/ml) für 1 Std. bei RT. Nach einem weiteren Waschritt wurden 10 ml RAM-HRP (1:100.000) hinzugegeben. Zuletzt erfolgte ein 7-maliges Waschen mit ECL-Waschlösung, die Inkubation mit ECL+plus-Reagenz sowie die Exposition mit einem Röntgenfilm wie bereits oben beschrieben.

#### **2.2.4.6 Silberfärbung**

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Silberfärbung sichtbar zu machen, wurde das entsprechende SDS-Gel für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln mit 50 ml Silberfärbungslösung A inkubiert. Es folgten 15- minütige Inkubationen jeweils mit 50 ml Silberfärbungslösung B und C. Anschließend wurde das Gel 1 Std. mit Aqua dest. gewässert. Nach einer weiteren Inkubation für 15 min bei RT auf einem Schüttler mit 50 ml Silberfärbungslösung D wurde das Gel wiederum mit Aqua dest. für 5 min gewaschen. Es folgte die Reduktionsreaktion mit 50 ml Silberfärbungslösung E bis zur Entwicklung sichtbarer Banden. Durch die

Zugabe von Essigsäure und damit verbundene pH-Wert-Änderung wurde die Farbreaktion gestoppt. Nach kurzem Wässern wurde das Gel bei RT getrocknet.

#### **2.2.4.7 Funktionelle Untersuchungen**

##### **A) In vitro Stimulationsexperiment**

In insgesamt 8 Vertiefungen einer 24-Loch Platte wurden jeweils  $10^7$  Granulozyten in 1 ml HBSS eingesetzt. Je zwei Ansätze wurden ohne Stimulans inkubiert, zwei mit jeweils  $5 \times 10^{-6}$  Mol fMLP, zwei mit GCSF (100 Einheiten je well) und zwei mit  $10^{-7}$  Mol Östrogen. Die Inkubation erfolgte im Zellkulturbrutschrank. Nach 30 min bzw. 24 Std. wurde ein Ansatz einer jeden Gruppe in ein 1,8 ml Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 10.000 UpM und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,8 ml Eppendorfgefäß überführt, das Pellet in 500 µl HBSS gelöst. Die Bestimmung des Anteils NB1 positiver Granulozyten und der NB1 Konzentration auf der Zelloberfläche erfolgte durch Quantitative Durchflusszytometrie, die Bestimmung der NB1 Konzentration im Überstand durch ELISA.

##### **B) In vivo Stimulationsexperiment**

Für in vivo Stimulationsexperimente wurde EDTA-Blut von Personen verwendet, welche für die Spende von Granulozyten mit GCSF stimuliert wurden. Das Blut wurde hierfür unmittelbar vor und einen Tag nach der GCSF-Gabe gewonnen. Die Isolierung von Plasma und Granulozyten erfolgte wie in Kap. 2.2.1.1 und 2.2.1.6 beschrieben. Es erfolgte die Bestimmung der NB1-Expression, des zellulären NB1-Gehalts und der Konzentration an NB1 im Plasma.

#### **2.2.4.8 Zellsortierung mit dem Durchflusszytometer**

Durch die Zellsortierung ist es möglich, die Zellen nach der Bestimmung ihrer antigenen Eigenschaften (s.o.) in verschiedene Gruppen einzuteilen und zu sortieren. Somit konnten NB1-negative Zellen von den NB1-positiven der gleichen Person getrennt und separat untersucht werden.

#### **2.2.4.9 Quantitative Bestimmung der Burstaktivität nach Inkubation mit Anti-NB1 Ak**

Die quantitative Bestimmung des oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten nach einer Vorinkubation mit Anti-NB1-Ak erfolgte teilweise mit Reagenzien des Bursttest (Phagoburst). Wie bereits beschrieben wurden aus 10 ml EDTA-Blut Granulozyten isoliert. Folgende Proben wurden für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert (jeweils 2-fach angesetzt):

- 1.)  $5 \times 10^5$  unfixierte Granulozyten + 10 µl Maus IgG (0,02 mg/ml)
- 2.)  $5 \times 10^5$  unfixierte Granulozyten + 10 µl MEM166 (0,02 mg/ml)
- 3.)  $5 \times 10^5$  unfixierte Granulozyten + 10 µl humanes Anti-NB1 (0,02 mg/ml)
- 4.)  $5 \times 10^5$  unfixierte Granulozyten + 10 µl humanes IgG (0,02 mg/ml)

Nach einer Inkubation mit 5 µl fMLP für 15 min bei 37°C im Wasserbad erfolgte bei jeweils 1 Ansatz einer jeden Proben die Zugabe von 10 µl DPI (50 µM) für ebenfalls 15 min im Wasserbad bei 37°C. Bei den übrigen Ansätzen wurde DPI durch 10 µl PBS ersetzt. Sämtliche Proben wurden anschließend mit 20 µl Substratpuffer für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Unmittelbar nach der Zugabe von je 200 µl Färbelösung für 10 min auf Eis und in Dunkelheit wurden die Proben am Durchflusszytometer gemessen.

#### **2.2.4.10 Adhäsionstest mit Kristall-Violett-Anfärbung**

Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen bzw. 2 µg E-Selektin pro Vertiefung einer 96-Loch Flachbodenplatte werden zusammen mit 250 µl des entsprechenden Mediums über Nacht bzw. für 4 Std. im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Das Zellkulturmedium wird abgesaugt und die Platte wird mit je 100 µl/Vertiefung 3 % BSA in HBSS für 1 Std. bei RT blockiert. In dieser Zeit erfolgt die Gewinnung der zweiten Zellgruppe (transfizierte bzw. untransfizierte Zellen) in HBSS. Nach der Blockierung wird die Platte 2 x mit jeweils 200 µl/Vertiefung HBSS gewaschen.  $2 \times 10^5$  Zellen in HBSS werden pro Vertiefung hinzugegeben und 1 Std. im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach 2-maligem Waschen wurden pro Vertiefung 150 µl eiskalte Fixierungslösung hinzugegeben und 15 min bei 4°C fixiert. Durch Abkippen und Trockenklopfen wurde die Fixierungslösung anschließend wieder entfernt und die Platte wurde danach für 30 min bei RT mit 50 µl/Vertiefung Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte das Auswaschen der restlichen Färbelösung in einer Schüssel mit lauwarmen Leitungswasser und gründlichem Trockenklopfen. Nach der Zugabe von 100 µl

Messlösung pro well erfolgte die Messung der Extinktion am Plattenphotometer bei 592 nm.

#### **2.2.4.11 Adhäsionstest mit Fluoreszenzmarkierung**

Je  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung, gelöst in 300  $\mu$ l Medium, wurden auf eine schwarze  $\mu$ -clear-Platte gegeben und über Nacht im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst die Blockierung noch freier Bindungsstellen auf der Platte mit jeweils 100  $\mu$ l PBS/BSA 3 % für 1 Std. In dieser Zeit wurde die zweite Zellgruppe mittels Accutase von ihren Platten abgelöst und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium eingestellt. Auf 2 ml Zellsuspension wurden 10  $\mu$ l BCECF gegeben und 1 Std. im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal durch Zentrifugation mit HBSS für 5 min bei 800 UpM gewaschen. Die Zellen auf der  $\mu$ -clear-Platte wurden zweimal mit je 200  $\mu$ l HBSS gewaschen. Nun wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung der zweiten Gruppe auf die Platte gegeben und 30 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde mit dem Fluoreszenz-Lesegerät FLX 800 (528 nm) gemessen. Nach der Absolutmessung wurde die Platte zweimal mit je 200  $\mu$ l HBSS/Vertiefung gewaschen und ein zweites Mal gemessen. Der Anteil an gebundenen Zellen wurde folgendermaßen ermittelt:

Anteil gebundener Zellen (%): 2. Messung / Absolutmessung x 100

### **2.2.5 Funktionelle Untersuchungen am Durchflusszytometer**

#### **2.2.5.1 Funktionelle Untersuchungen an Endothelzellen**

Für die funktionellen Untersuchungen am Durchflusszytometer wurde sowohl mit unstimulierten als auch mit stimulierten Endothelzellen gearbeitet. Für die Stimulation wurden die Zellen für 4 Std. mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml Zellkulturmedium) inkubiert. Anschließend wurden die Endothelzellen von der Petrischale abgelöst und pro Ansatz wurden  $10^5$  Zellen zusammen mit 1 ml Zellkulturmedium in ein 1,8 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von 4  $\mu$ g NB1-Protein je Ansatz erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Durch eine einmalige Zentrifugation bei 5.000 UpM für 1 min konnte anschließend der Überstand vorsichtig abpipettiert werden. Bei den erforderlichen Positivkontrollen wurden anstelle von NB1 4  $\mu$ g hPECAM-1

eingesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers. Dabei handelt es sich entweder um 25 µl 7D8-Überstand, um 20 µl Maus-IgG (0,02 mg/ml) bzw. um 1 µg Gi18. Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase bei 37°C und einer erneuten Zentrifugation erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers. Dies waren bei jedem Ansatz 40 µl FITC-markierter Rabbit-Anti-Mouse. Nach einer dritten Inkubationsphase für 30 min bei RT wurden die Zell-Protein-Antikörper-Komplexe abzentrifugiert. Die Auswertung am Durchflusszytometer erfolgte nach der Dekantierung des Überstands und der Hinzugabe von je 300 µl PBS ohne Ca<sup>++</sup>. Bei den Experimenten mit zuvoriger Blockierung der endothelialen PECAM-1-Moleküle durch Anti-PECAM-Antikörper wurden zunächst jeweils 4 µg PECAM 1.1, PECAM1.2 bzw. Gi18 auf die Endothelzellen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation und anschließender Zentrifugation erfolgte die einzelnen Inkubationsschritte wie zuvor beschrieben.

#### **2.2.5.2 Funktionelle Untersuchungen an E-Selektin**

2,5 x 10<sup>5</sup> CHO-NB1-Zellen bzw. untransfizierte Zellen werden in 100 µl HBSS eingesetzt. Nach der Zugabe von jeweils (je nach Testansatz) 0,5 – 4 µg E-Selektin werden die Zellen für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Durch eine nachfolgende Zentrifugation für 90 Sekunden bei 1200 UpM wird der nun vom Zellpellet abgetrennte Überstand verworfen. Diese Zentrifugation wird zweimal mit 100 µl HBSS wiederholt. Anschließend wird den Zellen 90 µl HBSS sowie 10 µl Anti-E-Selektin (FITC-markiert) hinzugegeben und für 1 Std. bei RT inkubiert. Nach wiederum zweimaligem Waschen durch Zentrifugation wird das Zellpellet auf einem Rüttler kurz aufgelockert und es werden je Ansatz 300 µl HBSS hinzugegeben. Anschließend erfolgt die Messung und Auswertung am Durchflusszytometer

### **2.3 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung und Verarbeitung der erzielten Ergebnissen wurden die Software-Programme Microsoft® Excel und SPSS. Mit SPSS erfolgte im allgemeinen zunächst die Überprüfung, ob bei den gewonnenen Daten eine Normalverteilung vorliegt. Sind die Werte normalverteilt, wurden Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Korrelationskoeffizient mit Excel berechnet. Die Überprüfung signifikanter Unterschiede erfolgte mittels T-Test.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Standardkurve

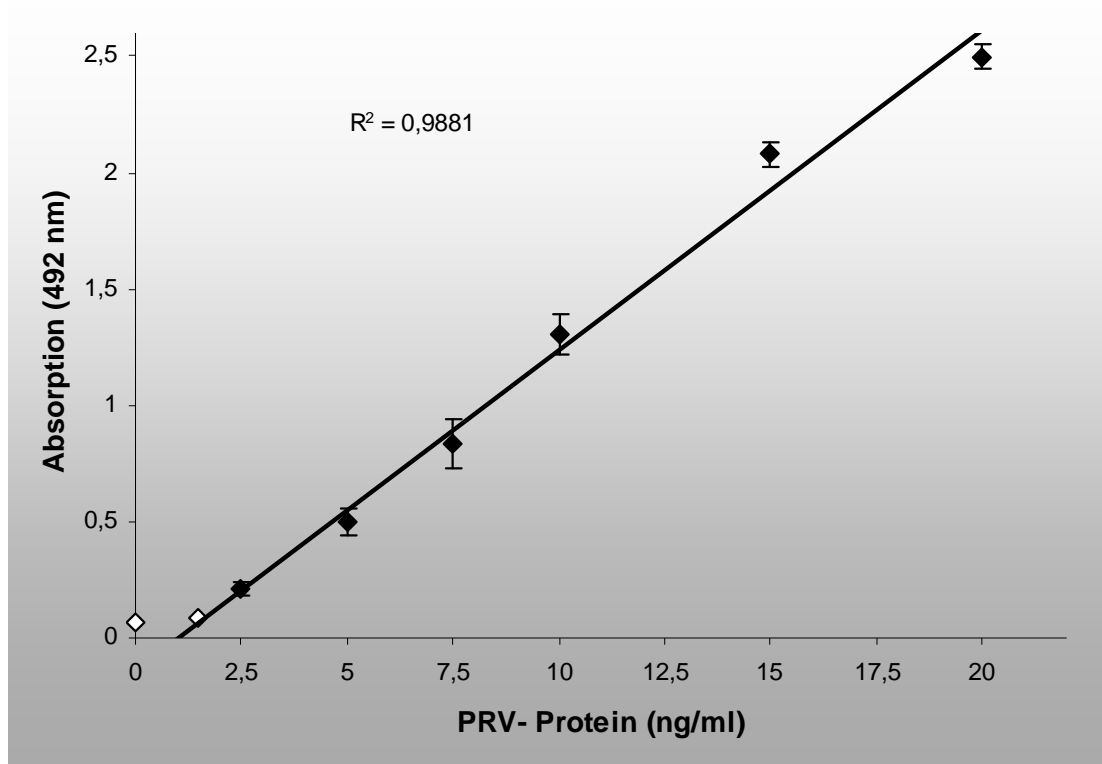
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ELISA etabliert, mit dem es möglich ist, die NB1 Konzentration quantitativ zu bestimmen, unter anderem in Plasma, Serum, Urin und Zell-Lysaten. Der Begriff „NB1-Gesamtzellgehalt“ ist dabei definiert als die Menge an NB1-Protein, die sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche zu finden ist. Im Gegensatz dazu gibt die Bezeichnung „NB1-Oberflächenkonzentration“ die durchschnittliche Menge an NB1-Oberflächenmolekülen pro NB1-positiver Zelle an, und „NB1-Expression“ beschreibt den prozentualen Anteil NB1-positiver Granulozyten an der gesamten Granulozytenpopulation.

Um die im ELISA-Testsystem ermittelten Werte umrechnen zu können, wurde zunächst eine Standardkurve konzipiert, mit deren Referenzwerten eine exakte Umrechnung der im ELISA ermittelten Optischen Dichte in eine Proteinkonzentration (ng/ml) möglich ist. Das hierfür als Referenzprotein verwendete PRV-Protein wurde uns freundlicherweise von Prof. H. Pahl (Freiburg) zur Verfügung gestellt. Jede Proteinverdünnung (minimale Konzentration 1,5 ng/ml, maximale Konzentration 20 ng/ml) wurde im dreifachen Ansatz in mit mAk MEM166 gecoateten Vertiefungen einer 96-well-Flachbodenplatte gegeben. Als Detektionsantikörper diente biotinmarkierter mAk 7D8. Die verwendeten Antikörper besitzen verschiedene Paratope, so dass eine kompetitive Blockierung der Bindungsstellen ausgeschlossen werden konnte. Die Auswertung erfolgte bei einer Absorption von 492 nm. Dieser Testansatz wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Werden die ermittelten Absorptionswerte gegen die korrespondierenden Proteinkonzentrationen aufgetragen (Abb. 3), zeigt sich ein linearer Verlauf bis zu einer Konzentration von 20 ng/ml. Die Nachweisgrenze dieses Testsystems wurde durch den Vergleich der Werte der Negativkontrolle (100 µl PBS) mit den einzelnen Verdünnungsstufen überprüft. Ab einer Konzentration von 2,5 ng/ml lag ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) vor. Bei der Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Testsystems ergab sich für die Intratestvarianz eine Standardabweichung (SD) zwischen 0,006 – 0,106 und für die Intertestvarianz eine Standardabweichung zwischen 0,03 – 0,15. Die sich aus den Testwerten ergebene Regressionsgerade  $y = 1,371x - 0,131$ , wobei  $y$  für die ermittelte Optische Dichte und  $x$  für die Proteinkonzentration steht, wurde letztlich zur Umrechnung der ELISA-



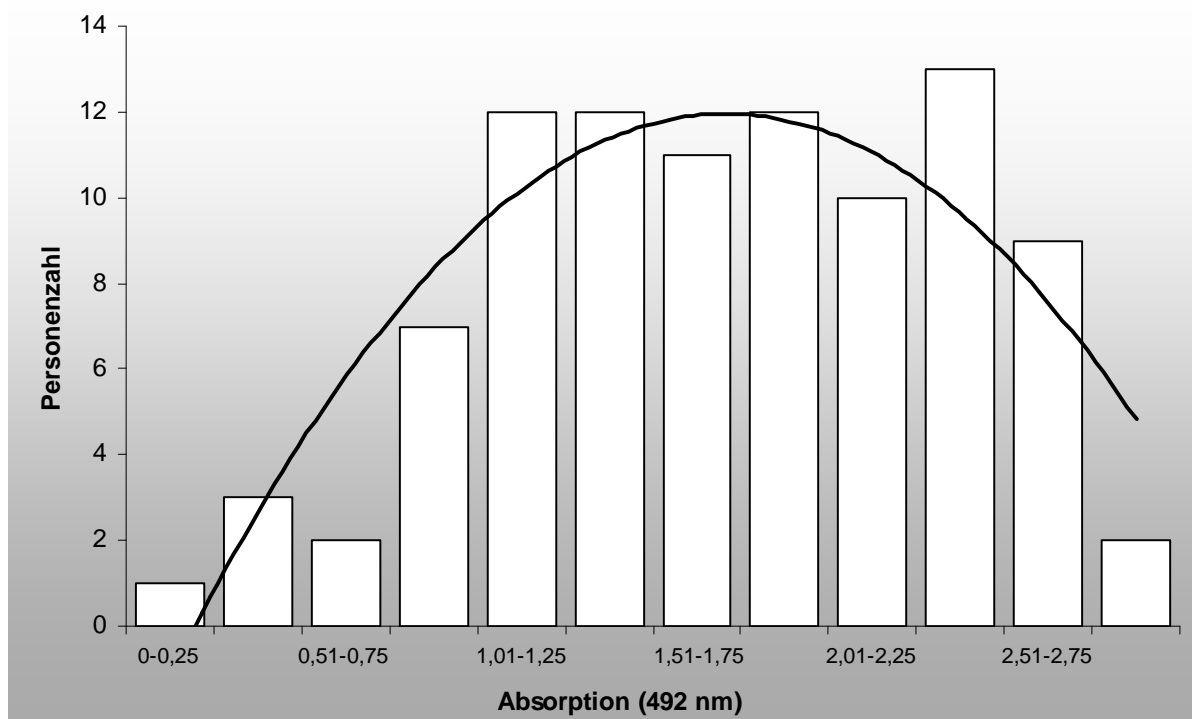
Ergebnisse in die jeweiligen NB1-Proteinkonzentrationen verwendet. Das Bestimmtheitsmaß, welches die Korrelation zwischen der Regressionsgeraden und den Messwerten angibt, beträgt  $R^2 = 0,988$ .



**Abb. 3:** Standardkurve für die Umrechnung der im ELISA ermittelten Absorption (Optische Dichte) in die entsprechende Proteinkonzentration (ng/ml). Die X-Achse beschreibt die eingesetzten Proteinkonzentrationen des Standards, die Y-Achse gibt die gewonnenen Absorptionswerte wieder. Die schwarzen Messpunkte stellen den sensitiven Messbereich dar (Mittelwert +/- SD).

### 3.2 Etablierung des ELISA-Testsystems

Um den Gesamtgehalt an NB1 durch den ELISA bestimmen zu können, wurden von den 94 Testpersonen jeweils  $5 \times 10^6$  Granulozyten lysiert und deren Gesamtproteingehalt bestimmt. Jede Probe wurde im ELISA im doppelten Ansatz mit gecoatetem mAk MEM166 und 7D8 als Detektionsantikörper gemessen. Zusätzlich wurden jeweils zwei verschiedene PRV-Proteinkonzentrationen (10 und 20 ng/ml) mitgeführt, um die ermittelten Absorptionswerte der Lysate mit der Standardkurve gleichzusetzen und in Proteinkonzentrationen umzurechnen. Abb. 4 zeigt die Verteilung der Absorptionswerte aller 94 Testpersonen. Der niedrigste Absorptionswert mit OD = 0,23 lag höher als der mittlere Wert der Negativkontrollen (100 µl PBS) mit OD = 0,16 und befand sich, ebenso wie die übrigen 93 Testwerte, im linearen Messbereich der Standardkurve. Anhand der Trendlinie lässt sich eine Normalverteilung für den NB1-Gesamtgehalt ableiten.



**Abb. 4:** Häufigkeitsverteilung der Absorptionswerte von Granulozytenlysaten von n = 94 Individuen

### 3.3 Quantifizierung

Um die ermittelten Absorptionswerte in die entsprechenden Proteinkonzentrationen umrechnen zu können, mussten zunächst die Absorptionswerte der Standardkurve und der PRV-Protein Kontrollmessungen miteinander verglichen werden. Anschließend wurden die Werte der Testpersonen entsprechend normalisiert.

So ergab sich bei Messung Nr. 1 (Personen Nr. 1-30) für den Standard folgende Absorptionswerte: 10 ng/ml : OD = 1,31; 20 ng/ml : OD = 2,41. Eine Normalisierung auf Werte der Standardkurve (OD = 1,30 bzw. OD = 2,44) war nicht erforderlich.

Bei Messung Nr. 2 (Personen Nr. 31-65) ergab sich für die Kontrollmessung 10 ng/ml eine OD von 1,33 und für 20 ng/ml eine OD von 2,49. Hier betrug das Verhältnis Kontrollmessung/Standardkurve 1/0,98 und für eine Gleichsetzung wurden sämtliche Messwerte mit dem Faktor 0,98 multipliziert.

Ebenfalls normalisiert werden mussten die Messergebnisse der Personen 66-94 (Kontrollmessung für 10 ng/ml : OD = 1,37, für 20 ng/ml : OD = 2,57). Aufgrund des Verhältnisses Kontrollmessung/Standardkurve von 1/0,95 wurde alle Werte mit 0,95 multipliziert.

Anschließend konnten nun die gleichgesetzten Messwerte (y) in die entsprechende Proteinkonzentration (x) umgerechnet werden. Dies erfolgte mit Hilfe der Regressionsgeraden der Standardkurve:

$$x = ( y + 0,131 ) / 1,371$$

Die einzelnen Proteinkonzentrationen sämtlicher Testpersonen sind in Tab. 8.2 des Anhangs aufgeführt.

### 3.4 Alters- bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede

Mehrere Arbeiten über das granulozytäre Antigen NB1 befassten sich bereits mit alters- bzw. geschlechtsbedingten Unterschieden in der Größe der NB1-positiven Subpopulation, und einige konnten dabei Unterschiede feststellen (Matsuo et al., 2000; Taniguchi et al., 2002; Caruccio et al., 2003). Untersuchungen zu Unterschieden im Gesamtgehalt an NB1 wurden allerdings nicht durchgeführt. Daher wurde die Testgruppe nach Geschlecht bzw. in drei verschiedene Altersgruppen (jünger als 30 Jahre, 30-44 Jahre, älter als 44 Jahre) unterteilt und auf Unterschiede im NB1-Zellgehalt hin überprüft (Tab. 2).

	<b>Gesamt (n=94)</b>	<b>Frauen (n=47)</b>	<b>Männer (n=47)</b>	<b>&lt; 30 a (n=31)</b>	<b>30- 44 a (n=35)</b>	<b>&gt; 44 a (n=28)</b>
<b>Mittelwert</b>	89,3	93,5	85,2	91,1	89,2	87,5
<b>Standardabw.</b>	± 30,6	± 27,5	± 33,2	± 26,2	± 32,4	± 31,8
<b>Min. – Max. Wert</b>	17,6 – 143,5	20,0 – 141,1	17,6 – 143,5	42,4 – 134,3	20,0 – 143,5	17,6 – 139,1

	<b>Frauen &lt; 30 a (n=18)</b>	<b>Frauen 30- 44 a (n=17)</b>	<b>Frauen &gt; 44 a (n=12)</b>	<b>Männer &lt; 30 a (n=13)</b>	<b>Männer 30- 44 a (n=18)</b>	<b>Männer &gt; 44 a (n=16)</b>
<b>Mittelwert</b>	92,4	96,3	90,2	88,7	81,7	86,2
<b>Standardabw.</b>	± 24,9	± 30,7	± 30,4	± 34,5	± 33,4	± 33,8
<b>Min. – Max. Wert</b>	47,7 – 134,3	20,0 – 141,1	59,9 – 133,8	42,4 – 130,9	26,8 – 143,5	17,6 – 139,1

**Tab. 2:** Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) des Gesamtgehalts an NB1 (ng/ml) des Gesamtkollektivs bzw. verschiedener alters- und geschlechtsabhängiger Untergruppen.

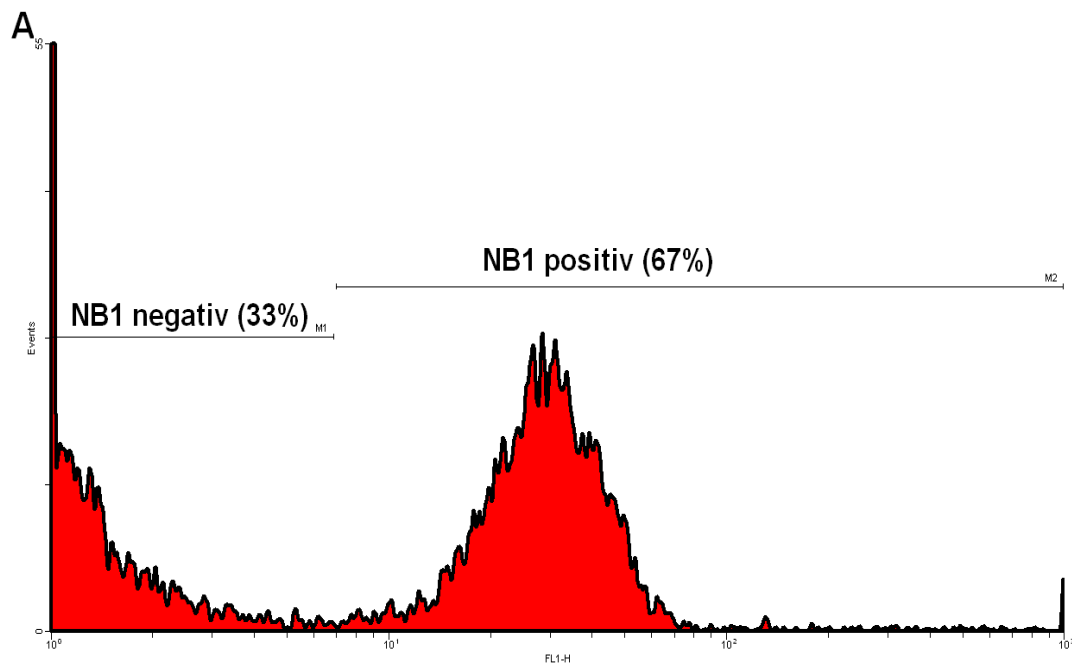
Der mittlere NB1-Zellgehalt betrug insgesamt  $89,3 \pm 30,6$  ng/ml. Dabei zeigte die Gruppe der Frauen mit einem Gehalt von  $93,5 \pm 27,5$  ng/ml einen höheren mittleren Wert als die Gruppe der Männer mit  $85,2 \pm 33,2$  ng/ml. Dies korreliert zwar mit einigen Untersuchungen über die NB1-Expression, wo ebenfalls Frauen höhere Werte erreichen. Allerdings ist hier der Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,16$ ). Ähnliches zeigt sich auch bei den verschiedenen Altersgruppen. Die Gruppe der

Personen, welche älter als 44 Jahre ist, weist mit  $87,5 \pm 31,8$  ng/ml einen geringeren (jedoch nicht signifikanten) Mittelwert als die übrigen Gruppen mit  $91,1 \pm 26,2$  ng/ml ( $p = 0,45$ ) bzw.  $89,2 \pm 32,4$  ng/ml ( $p = 0,43$ ).

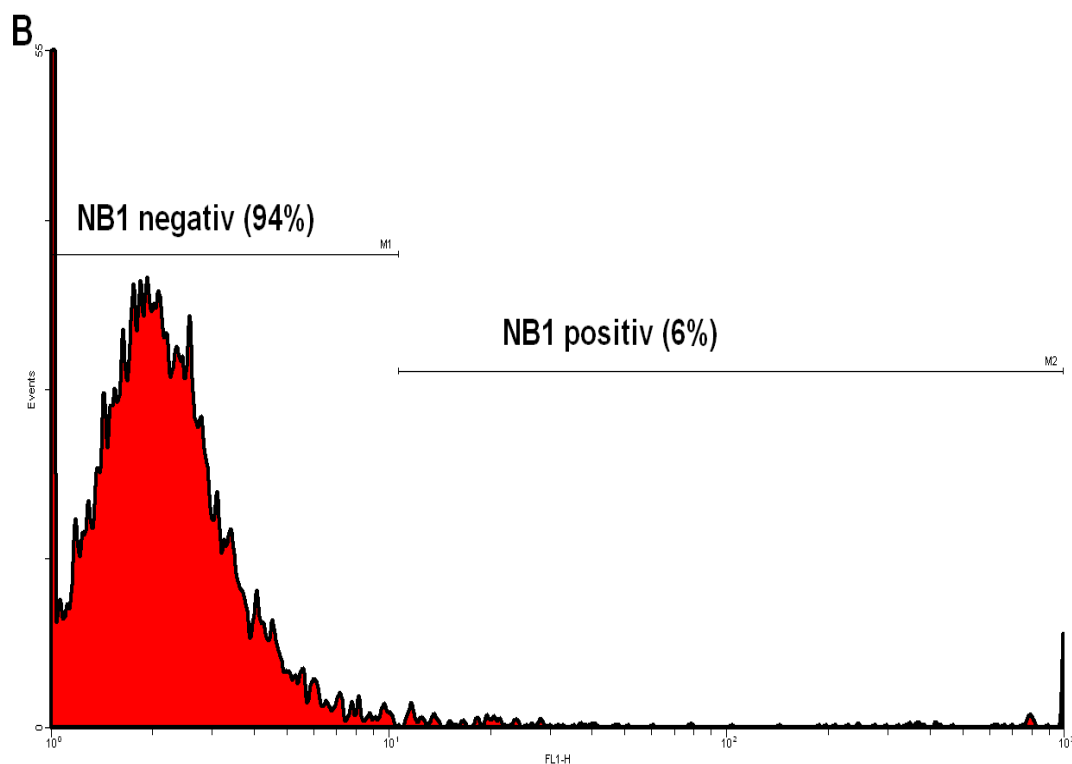
### **3.5 Heterogene Expression von NB1**

#### **3.5.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der NB1-Oberflächenexpression und-Oberflächenkonzentration**

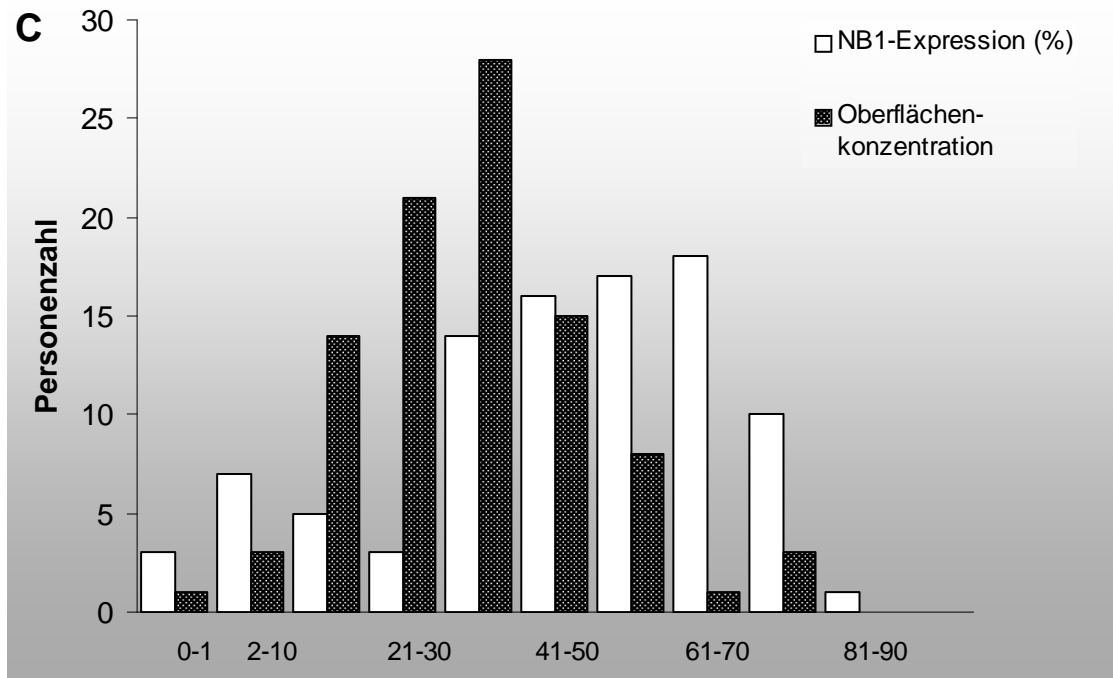
Aufgrund der hohen Variabilität der NB1-Oberflächenexpression und der Antigenkonzentration auf der Zelloberfläche sollten von sämtlichen 94 Testpersonen die Größe der NB1-negativen und NB1-positiven Zellpopulation sowie die Menge an NB1 auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Dabei wurden die Granulozyten zunächst mit mAk 7D8 inkubiert und die positiven Zellen schließlich mit einem zweiten, FITC-markierten Antikörper (Rabbit-Anti-Mouse-IgG) markiert. Anschließend wurde die Größe der negativen und positiven Subpopulation bestimmt und deren Anteil an der Gesamtzellzahl ermittelt. Die mittlere Oberflächenkonzentration von NB1 auf den positiven Zellen wurde berechnet durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität mit der jeweiligen Standardkurve der Calibration-Beads. Abb. 5A und 5B zeigen beispielhaft die Darstellung der Granulozyten-Subpopulationen im Durchflusszytometer, zum einen von einer Person mit einer großen (67 %) NB1-positiven Subpopulation, zum anderen von einer Person mit einer kleinen (6 %) NB1-positiven Subpopulation.



**Abb. 5A :** Darstellung der Granulozyten-Subpopulationen am Durchflusszytometer (x-Achse: relative Fluoreszenz-Intensität, y-Achse: Zellzahl). Beispiel für eine Person mit 67 % NB1-positiven Granulozyten.



**Abb. 5B :** Darstellung der Granulozyten-Subpopulationen am Durchflusszytometer (x-Achse: relative Fluoreszenz-Intensität, y-Achse: Zellzahl). Beispiel für eine Person mit 6 % NB1-positiven Granulozyten



**Abb. 5C :** Häufigkeitsverteilung der NB1-Expression bzw. der NB1-Oberflächenkonzentration aller 94 Testpersonen.

**NB1-Expression:** Werte angegeben als Größe der NB1-positiven Subpopulation (%).

**Oberflächenkonzentration:** Werte angegeben als Anzahl der Moleküle  $\times 10^3$  pro positiver Zelle.

Abb. 5C zeigt die Verteilung der NB1-Expression bzw. der NB1-Oberflächenkonzentration aller 94 Testpersonen. Bei der NB1-Expression zeigt sich eine Normalverteilung der Werte, wobei 2/3 der Werte zwischen 40-80 % NB1-positiver Zellen liegen. Der Mittelwert beträgt  $47,1 \% \pm 21,3 \%$ . Für nachfolgende Untersuchungen wurden die Personen anhand ihrer NB1-Expression in drei Gruppen unterteilt : 1. sogenannte Niedrigexprimierer (0-40 %), 2. Mittelexprimierer (41-60 %) und 3. Hochexprimierer (61-100 %). Diese Einteilung erfolgte bereits bei früheren Arbeiten (Wolff et al. 2003). Die Verteilung der Testpersonen auf die einzelnen Gruppen ist mit 32, 33 bzw. 29 Personen nahezu identisch.

Auch die Werte der mittleren Oberflächenkonzentration pro NB1-positiver Zelle sind normalverteilt. 2/3 der Werte liegen im Bereich zwischen  $25 - 45 \times 10^3$  Molekülen pro Zelle mit einem Mittelwert von  $33,3 \times 10^3$  Molekülen/Zelle. Aus diesen beiden Messwerten lässt sich ein weiterer aussagekräftiger Wert errechnen. Die Gesamtoberflächenmenge an NB1 ergibt sich aus der Multiplikation der NB1-Expression (d.h. dem Anteil an NB1-positiven Zellen) mit der Oberflächenkonzentration. Er beschreibt die Menge an auf der Oberfläche

vorhandenem NB1. So ist beispielsweise der Gesamtoberflächenmenge an NB1 bei einer Person mit einer großen NB1-positiven Subpopulation mit gleichzeitig niedriger Oberflächenkonzentration geringer als bei einer Person mit einer mittleren NB1-Expression mit einer mittleren Oberflächenkonzentration (z.B. Anhang Tab. 8.2 (1), Personen Nr. 14 & 24).

### **3.5.2 Konstanz der NB1-Expression und der NB1-Oberflächenkonzentration**

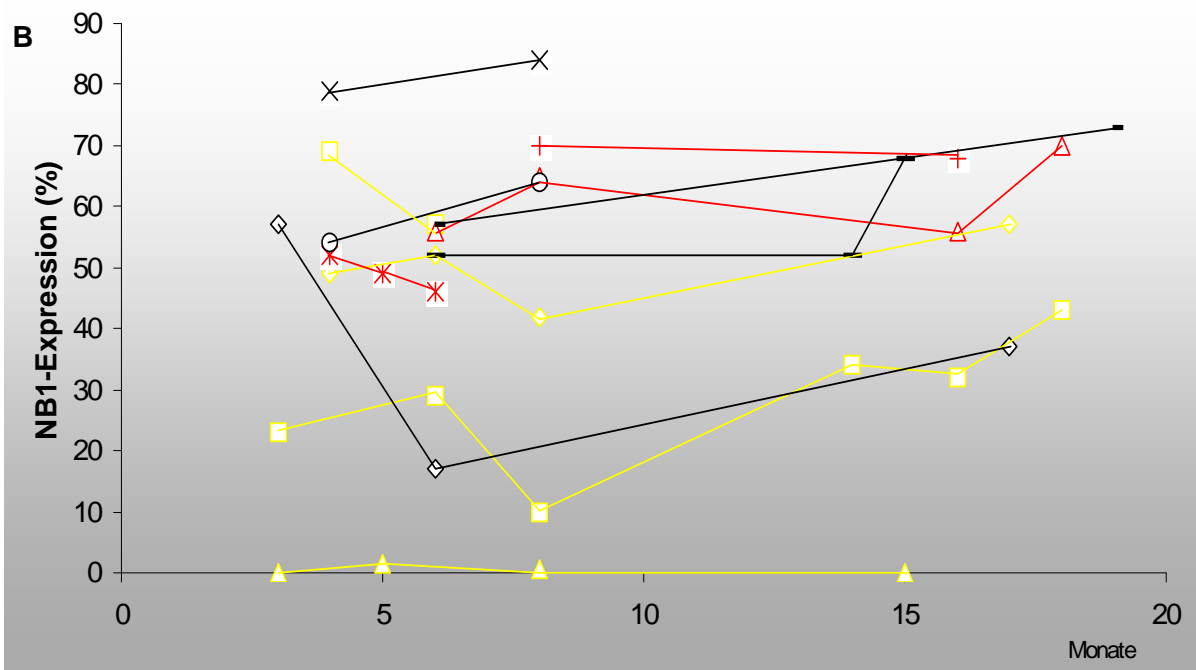
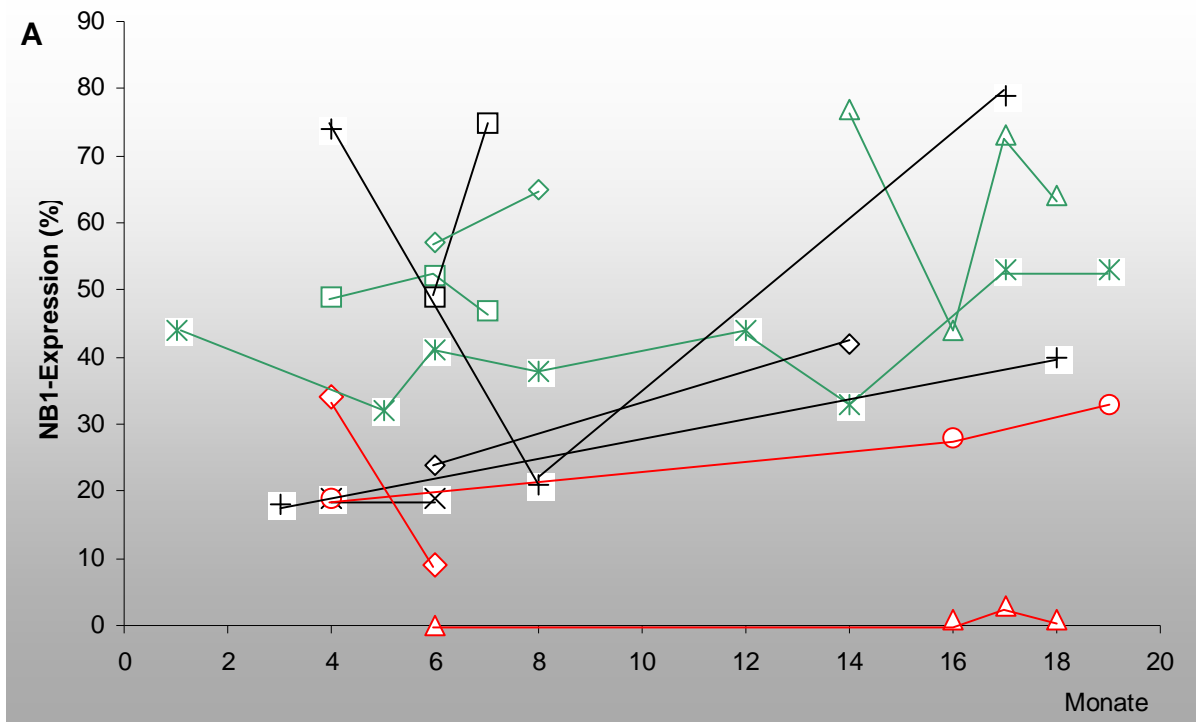
Da die einmalige Messung der Expression und der Oberflächenkonzentration von NB1 nur eine augenblickliche Betrachtung ermöglicht, wurden bei 24 Personen wiederholte Messungen durchgeführt. Obwohl schon in einer der ersten Untersuchungen zur heterogenen Expression von NB1 wiederholte Messungen erfolgten (Goldschmeding et al., 1992) und diese ein interessantes Ergebnis aufzeigten (s. Kap. 1.3.1), wurde dies in späteren Veröffentlichungen nicht weiter hinterfragt.

Die einzelnen Messungen wurden bewusst nicht im gleichen Zeitabstand wiederholt, sondern willkürlich in verschiedenen Zeiträumen durchgeführt, so dass der Abstand zwischen den Messungen von 2 Wochen bis zu einem Jahr betrug. Auch die Zahl der Wiederholungen bei den einzelnen Personen wurden unterschiedlich angesetzt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 6A und 6B dargestellt.

Es fällt auf, dass die NB1-Expression bei den einzelnen Personen grundsätzlich sehr unterschiedlich verläuft. Während es einige Individuen gibt, bei denen die Expression weitestgehend gleichmäßig verläuft (z.B. 49 %, 52 %, 47 %, gemessen über 4 Monate bei Person V2), gibt es andere, deren Werte geringgradige Schwankungen aufweisen (32 %, 41 %, 38 %, 44 %, 33 %, 53 %, 53 %, gemessen über 19 Monate bei Person V5). Zusätzlich gibt es Personen, welche extreme Schwankungen aufzeigen (74 %, 21 %, 79%, gemessen über 13 Monate bei Person V6 oder 57%, 17%, 37%, gemessen über 14 Monate bei Person V22). Aufgrund der großen Variabilität lassen sich Ungenauigkeiten in der Messung als einzige Ursache ausschließen. Auffallend sind die Verläufe der beiden Personen mit negativen bzw. extrem niedrigen Werten. Hier zeigen sämtliche Wiederholungen die gleichen Messwerte.

Vergleicht man die Variabilität der Messungen zwischen der Gruppe der Männer und der Gruppe der Frauen, so lässt sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied feststellen ( $p = 0,46$ ).



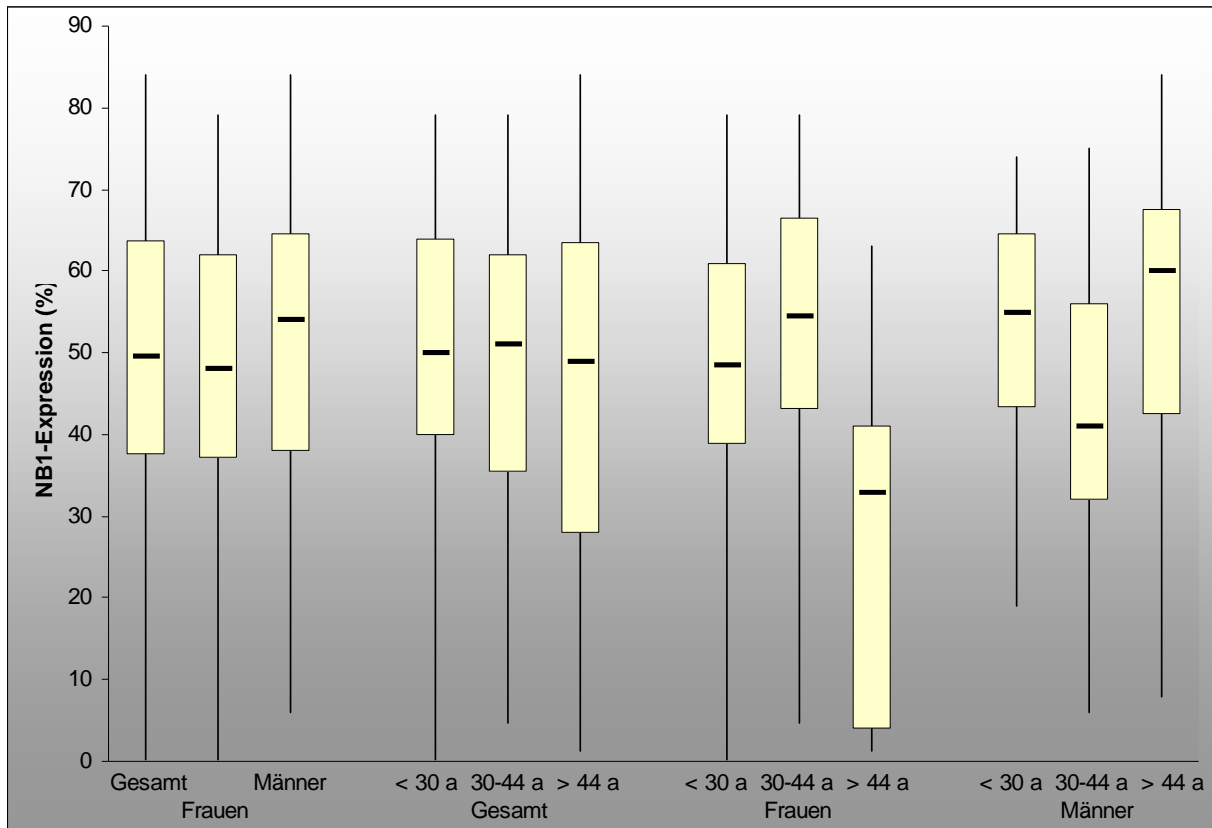


**Abb. 6 A & B:** Größe der NB1-positiven Subpopulation bei verschiedenen Personen, gemessen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zur besseren Unterscheidung wurden verschiedene Farben verwendet, wobei die grün markierten Personen (Abb. 6 A) die männlichen Testpersonen darstellen (n=24).

Betrachtet man den Verlauf der Oberflächenkonzentration von NB1 bei den verschiedenen Messungen, so zeigt sich ein Bild ähnlich der NB1-Expression. Auch hier gibt es Personen, bei denen die Werte konstant bleiben, sehr unterschiedlich verlaufen oder auch alternieren. Dabei steht der Verlauf der Oberflächenkonzentration in keinem direkten Zusammenhang mit dem Verlauf der NB1-Expression der gleichen Person. Betrachtet man die Korrelationskoeffizienten zwischen Expression und Oberflächenkonzentration bei den Personen mit mindestens drei Messungen, so weisen 3 Personen eine hohe positive Korrelation ( $r > 0,60$ ), 4 keine Korrelation ( $r = -0,59 - 0,59$ ) und 3 Personen eine hohe negative Korrelation auf ( $r < -0,6$ ). Auffallend ist jedoch, dass bei Testperson V5 mit alternierender NB1-Expression ebenfalls die Werte der Oberflächenkonzentration alternieren, und das bei Person V4 sowohl die Expression als auch die Oberflächenkonzentration bei beiden Messungen identisch waren. Bei den beiden Personen mit negativer bzw. extrem niedriger NB1-Expression zeigte die Oberflächenkonzentration, soweit eine Messung durchführbar war, ebenso variable Werte wie bei den übrigen Testpersonen.

### 3.5.3 Alters- bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede der NB1-Expression

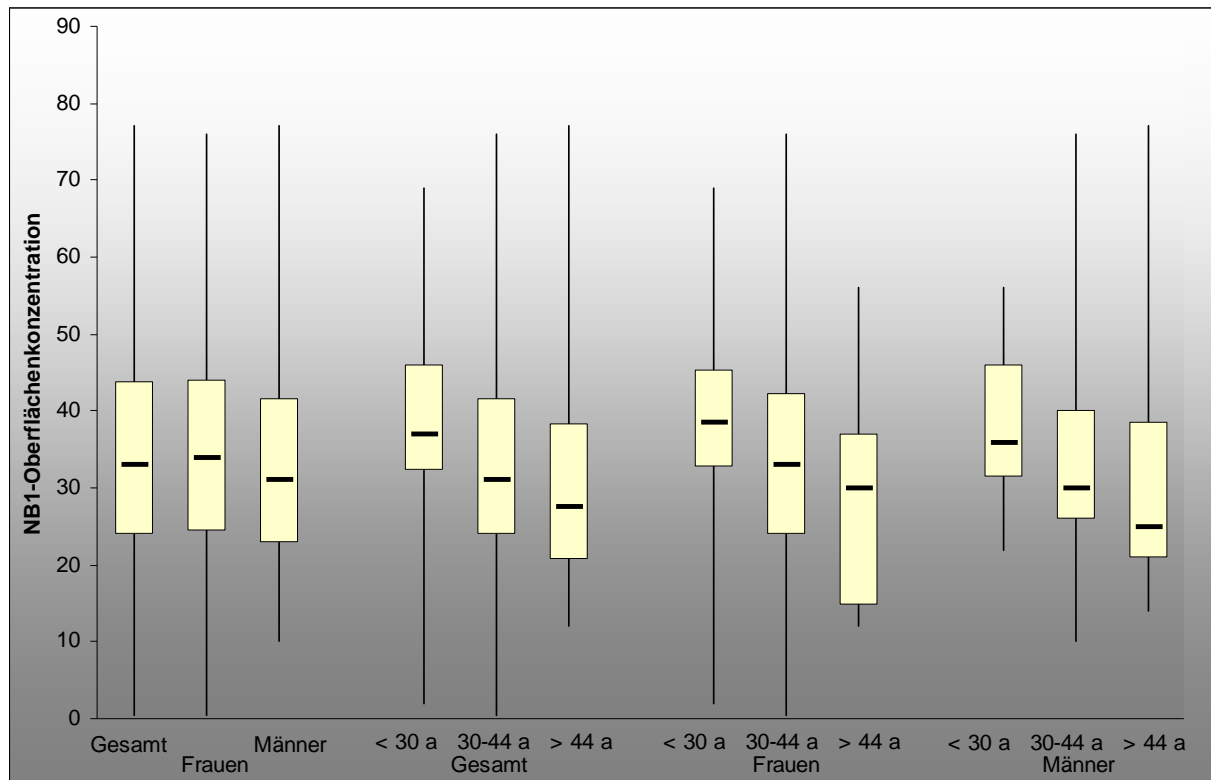
#### A. NB1-Expression



**Tab. 3a: Geschlechts- bzw. altersabhängiger Vergleich der NB1-Expression (%). Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert (n=94).**

Der Medianwert der NB1-Expression beträgt 49,5 %, wobei Frauen einen niedrigeren, jedoch nicht signifikanten ( $p = 0,43$ ) Wert aufweisen als Männer. Bezüglich verschiedener Altersgruppen lassen sich keine Unterschiede feststellen. Betrachtet man die Altersgruppen separat nach Geschlechtern, so zeigt die Gruppe der Frauen ab 45 Jahren mit 33 % einen vergleichsweise sehr niedrigen Expressionswert, welcher sich signifikant von den Werten der übrigen Frauen ( $p = 0,024$ ) bzw. von den Männern der gleichen Altersgruppe ( $p = 0,019$ ) unterscheidet.

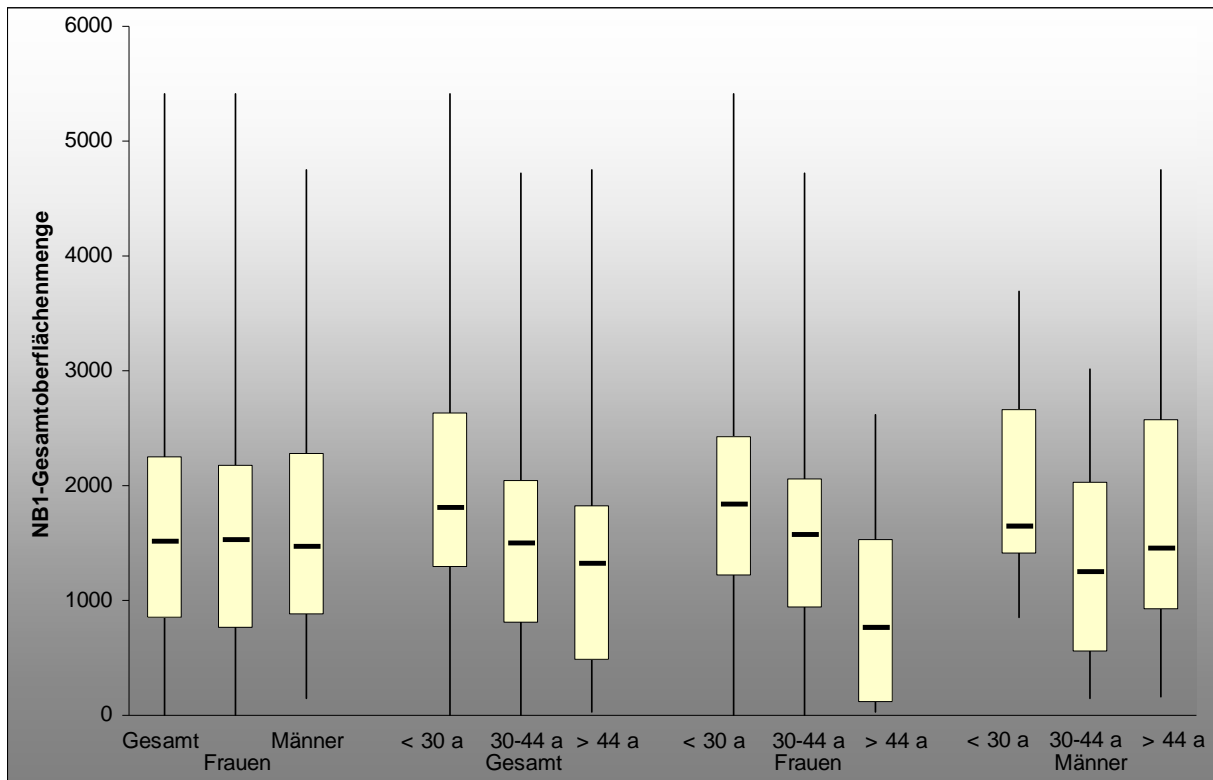
## B. NB1-Oberflächenkonzentration



**Tab. 3b:** Geschlechts- bzw. altersabhängiger Vergleich der NB1-Oberflächenkonzentration ( $\times 10^3$  NB1-Oberflächenmolekülen pro NB1-positiver Zelle). Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert (n=94).

Hinsichtlich der mittleren Anzahl an NB1-Molekülen auf der Oberfläche NB1-positiver Zellen zeigen sich keine Unterschiede zwischen der Gruppe der Frauen und der Männer. Zwar ist auffällig, dass die mittlere Oberflächenkonzentration bei beiden Gruppen mit zunehmenden Alter abfällt, allerdings sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

### C. NB1-Gesamtoberflächenmenge

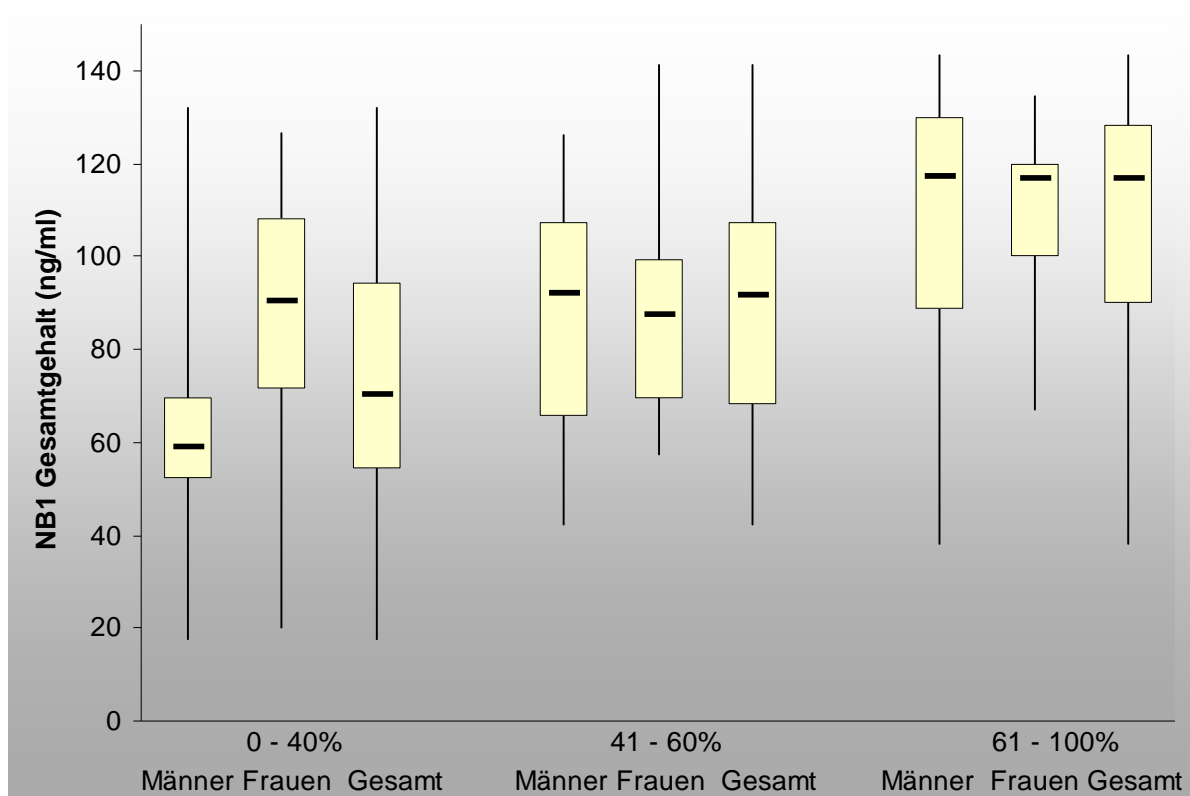


**Tab. 3a:** Geschlechts- bzw. altersabhängiger Vergleich der NB1-Gesamtoberflächenmenge (entspricht der NB1-Expression multipliziert mit der Oberflächenkonzentration). Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert (n=94).

Da die NB1-positive Subpopulation individuell sehr unterschiedlich ist, zeigt der Wert der Gesamtoberflächenmenge, also der relative Anteil NB1-positiver Zellen multipliziert mit der Oberflächenkonzentration, sehr deutlich die tatsächlich vorhandene Zahl an NB1-Molekülen. Signifikante Unterschiede konnten hier nur wiederum in der Gruppe der Frauen älter als 44 Jahre gefunden werden, welche im Vergleich zu den übrigen Frauen ( $p = 0,034$ ) geringere Werte aufwiesen.

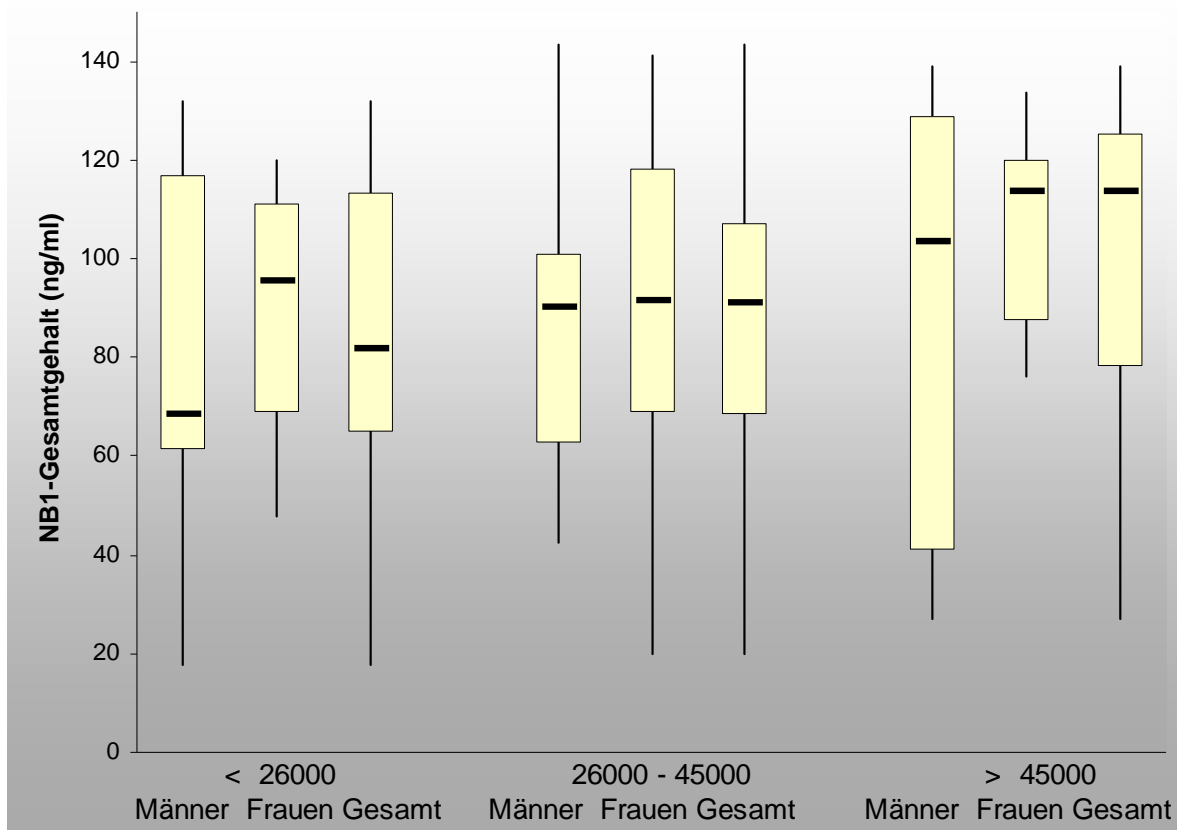
#### **3.5.4 Vergleich des NB1-Gesamtgehalts mit der NB1-Expression, der -Oberflächenkonzentration und der -Gesamtoberflächenmenge**

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse konnten nun der NB1-Gesamtgehalt mit der NB1-Expression, der NB1-Oberflächenkonzentration sowie der NB1-Gesamtoberflächenmenge der einzelnen Personen miteinander verglichen werden. Dies diene vor allem zur Beantwortung der Frage, ob es einen direkten Zusammenhang gibt zwischen der Menge an intrazellulärem NB1 und dem Teil, welcher auf der Oberfläche präsentiert wird. Abb. 7 zeigt den Zusammenhang zwischen dem NB1-Gesamtgehalt (ng/ml) und der NB1-Expression (prozentualer Anteil der NB1-positiven Subpopulation). Hierfür wurden die Testpersonen anhand ihrer NB1-Expression in drei Gruppen (0-40 %, 41-60 %, 61-100 %) unterteilt. Es zeigt sich, dass die Gruppe mit einer hohen NB1-Expression einen hoch signifikant größeren NB1-Gesamtgehalt aufweist als die übrigen Personen ( $p < 0,001$ ). Umgekehrt weist die Gruppe mit der niedrigen Expression einen kleineren Gesamtgehalt auf als die übrigen Personen. Dieser Unterschied ist ebenfalls hoch signifikant ( $p < 0,001$ ), wobei insbesondere die männlichen Testpersonen extrem niedrige Werte aufweisen, welche sich auch von den weiblichen Testpersonen dieser Gruppe deutlich unterscheiden ( $p = 0,018$ ). Bei den Testgruppen mit mittlerer bzw. hoher NB1-Expression zeigt sich dagegen kein geschlechtsspezifischer Unterschied. Vergleicht man die Werte der NB1-Expression mit dem NB1-Gesamtgehalt bei jeder Person, so zeigt sich eine Auffälligkeit bei den beiden Personen mit einer äußerst geringen NB1-Expression (NB1 < 1 %). Obwohl diese eine äußerst geringe Expression aufweisen, liegen ihre Werte für den Gesamtgehalt (59,9 bzw. 96,3 ng/ml) im mittleren Bereich der entsprechenden Gruppe.



**Abb. 7: NB1-Gesamtgehalt (ng/ml) der Personen bzw. Frauen und Männer mit niedriger (0-40 %), mittlerer (41-60 %) und hoher (61-100 %) NB1-Expression. Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert (n=94).**

Unterteilt man die Testpersonen anhand ihrer NB1- Oberflächenkonzentration in drei Gruppen ( $< 26 \times 10^3$ ,  $26-45 \times 10^3$ ,  $> 46 \times 10^3$ ) und vergleicht deren NB1-Gesamtgehalt, so zeigt sich ein Anstieg im Medianwert je höher die NB1-Oberflächenkonzentration ist (Abb. 8). Dieses Ergebnis korreliert zwar mit den Ergebnissen zur NB1-Expression, allerdings sind hier die Unterschiede nicht signifikant. Gleichmaßen wie bei der NB1-Expression besitzen die männlichen Testpersonen mit einer niedrigen Oberflächenkonzentration einen vergleichsweise geringeren NB1-Gesamtgehalt als die weiblichen Testpersonen, doch auch hier ist der Unterschied statistisch nicht signifikant ( $p = 0,55$ ).

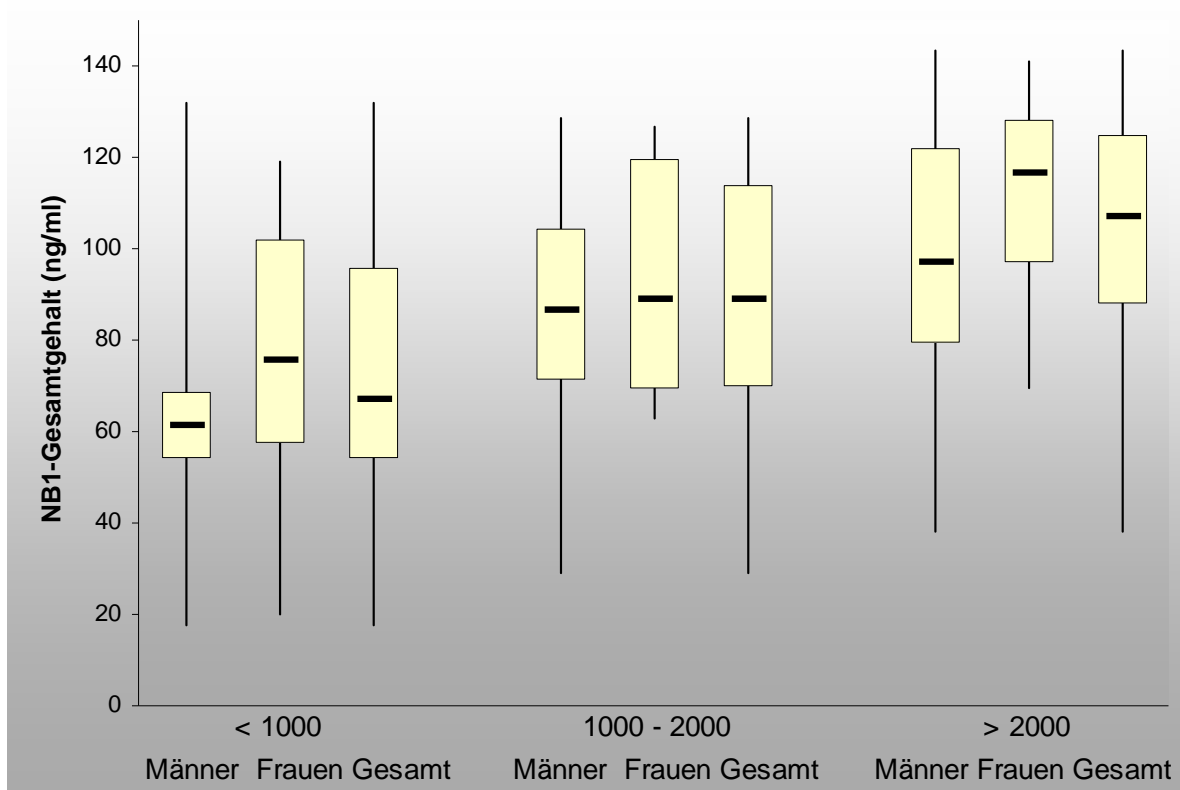


**Abb. 8:** NB1-Gesamtgehalt (ng/ml) der Personen bzw. Frauen und Männer mit niedriger ( $< 26 \times 10^3$  Molekülen pro Zelle), mittlerer ( $26-45 \times 10^3$  Molekülen pro Zelle) und hoher ( $> 45 \times 10^3$  Molekülen pro Zelle) NB1-Oberflächenkonzentration. Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert (n=94).

Die deutlichsten Unterschiede im NB1-Gesamtgehalt zeigen sich, wenn die Testpersonen anhand ihrer NB1-Gesamtoberflächenmenge differenziert werden (Abb. 9). So kam es auch hier wiederum zu einer Unterteilung in drei verschiedene Gruppen. Solche mit einer niedrigen NB1-Gesamtoberflächenmenge besitzen einen relativen Wert von maximal  $1 \times 10^6$  Molekülen, der mittlere Bereich liegt bei  $1-2 \times 10^6$  Molekülen, und die Gruppe mit einer hohen NB1-Gesamtoberflächenmenge haben einen Wert von mindestens  $2 \times 10^6$  NB1-Molekülen. Bei folgenden Gruppen kam es zu statistisch signifikanten Unterschieden: Die Gruppe mit einer niedrigen Gesamtoberflächenmenge besitzt auch den niedrigsten mittleren NB1-Gesamtgehalt ( $p < 0,001$ ). Gleichzeitig hat die Gruppe mit einer hohen Gesamtoberflächenmenge auch hohe Gesamtwerte ( $p < 0,001$ ). Unterteilt man die einzelnen Gruppen zusätzlich noch nach dem Geschlecht, so zeigt sich das gleiche Ergebnis sowohl bei der Gruppe der Männer als auch bei den Frauen. Keine Unterschiede im NB1-



Gesamtgehalt gibt es zwischen Männern und Frauen innerhalb der einzelnen Gruppen.



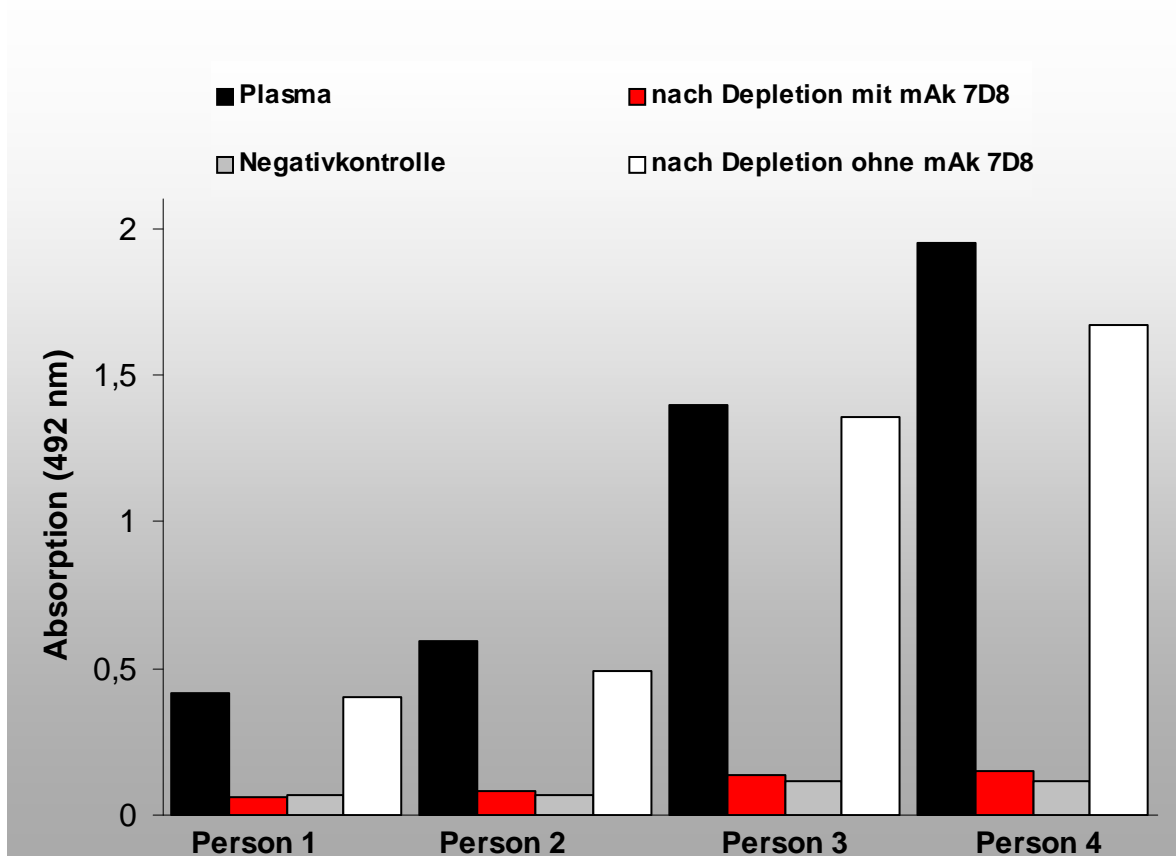
**Abb. 9:** NB1-Gesamtgehalt (ng/ml) der Personen bzw. Frauen und Männer mit niedriger (relativer Wert:  $< 1000 \times 10^3$  Molekülen), mittlerer ( $1000-2000 \times 10^3$  Molekülen) und hoher ( $> 2000 \times 10^3$  Molekülen) NB1-Gesamtoberflächenmenge. Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert (n=94).

### **3.6 Untersuchungen zur löslichen Form von NB1**

Durch verschiedene Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das NB1-Protein auf der granulozytären Oberfläche durch GPI verankert ist (Skubitz et al., 1991; Goldschmeding et al., 1992; Kissel, 2002). Bei zahlreichen GPI-verankerten Proteinen ist die Möglichkeit einer Abspaltung und Freisetzung von der Zelloberfläche ins Plasma durch spezifische Phospholipasen nachgewiesen worden (s. Kap. 1.2.2). Dadurch sind diese Proteine im Plasma als eigenständige lösliche Form zu finden, was für die weitere Funktion des jeweiligen Proteins von Bedeutung sein kann. Eine lösliche Form von NB1 im Plasma konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Daher war es in dieser Arbeit zum einen das Ziel, durch verschiedene Methoden das Vorhandensein von NB1 im Plasma aufzuzeigen. Zum anderen sollte nachgewiesen werden, dass es sich bei den evtl. vorhandenen Proteinen um eine lösliche Form von NB1 handelt, und nicht um Artefakte von Granulozytenmembranen.

#### **3.6.1 Depletion von NB1 aus dem Plasma durch Sepharose A**

Für den Nachweis von NB1 im Plasma wurde zunächst Sepharose A mit dem Anti-NB1-Ak 7D8 gekoppelt und mit dem zu untersuchenden Plasma inkubiert. Nach Zentrifugation des Plasma-Sepharose Gemisches wurde der Plasma-Überstand mittels ELISA (s. Kap. 3.1.3) auf seinen NB1-Gehalt hin überprüft. Zusätzlich wurde der NB1-Gehalt im Plasma ohne eine vorherige Depletion sowie nach einer Depletion mit Sepharose ohne mAk 7D8 gemessen (Abb. 10). Vergleicht man die Absorptionswerte des Plasma-NB1-Gehalts, so ist nach einer Depletion durch Sepharose mit mAk 7D8 kein NB1-Protein mehr nachweisbar. Die Absorptionswerte zeigen die gleichen Werte wie die jeweilige Negativkontrolle (100 µl PBS). Erfolgt die Depletion mit Sepharose ohne den mAk 7D8, so erreichen die Absorptionswerte fast die gleichen Level wie die der Plasmen ohne vorherige Depletion. Somit zeigt sich, dass im Plasma NB1-Proteine existieren, welche durch den mAk 7D8 erkannt werden und dass es sich hierbei um eine spezifische Bindung handelt.

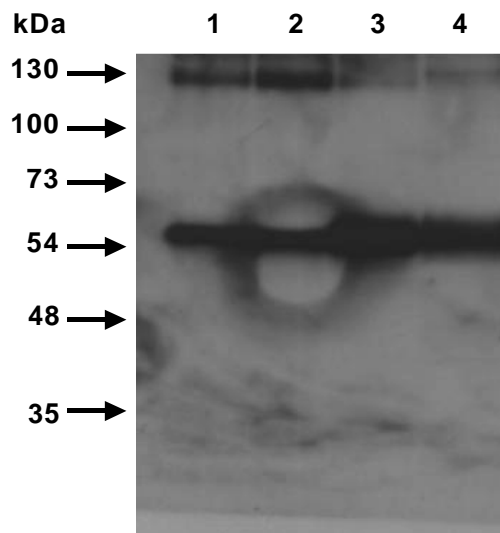


**Abb. 10:** Absorptionswerte von Plasma ohne Depletion; nach einer Depletion durch Sepharose mit mAk 7D8; nach einer Depletion durch Sepharose ohne mAk 7D8; der Negativkontrolle (100 µl PBS).

### 3.6.2 Nachweis von NB1 im Plasma mittels Immunpräzipitation

Um zu zeigen, dass es sich bei der vorangegangenen Depletion auch wirklich um das NB1-Protein handelt, welches depletiert wurde, und um weiterhin das Molekulargewicht des im Plasma vorkommenden Antigens zu bestimmen, wurde das depletierte Antigen immunpräzipitiert. Dazu wurden die Immunobeads nach der Depletion gekocht, um eine Ablösung des Ak und des NB1-Proteins von der Sepharose zu erreichen. Nach einer anschließender Zentrifugation wurde der Überstand mit mAk 7D8 immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurden neben dem Plasma eines „Hochexprimierers“ (75 % NB1-positive Granulozyten) und eines „Niedrigexprimierers“ (8 % NB1 positive Granulozyten) auch der Überstand einer Kultur NB1-transfizierter CHO-Zellen sowie Granulozytenlysat verwendet. Abb. 11 zeigt das Ergebnis der Immunpräzipitation. In allen vier Spuren ist eine Bande im Bereich von ca. 58 kDa vorhanden. Dies entspricht dem aus der Literatur bekannten Molekulargewicht von NB1. Somit sind sowohl im Granulozytenlysat, im

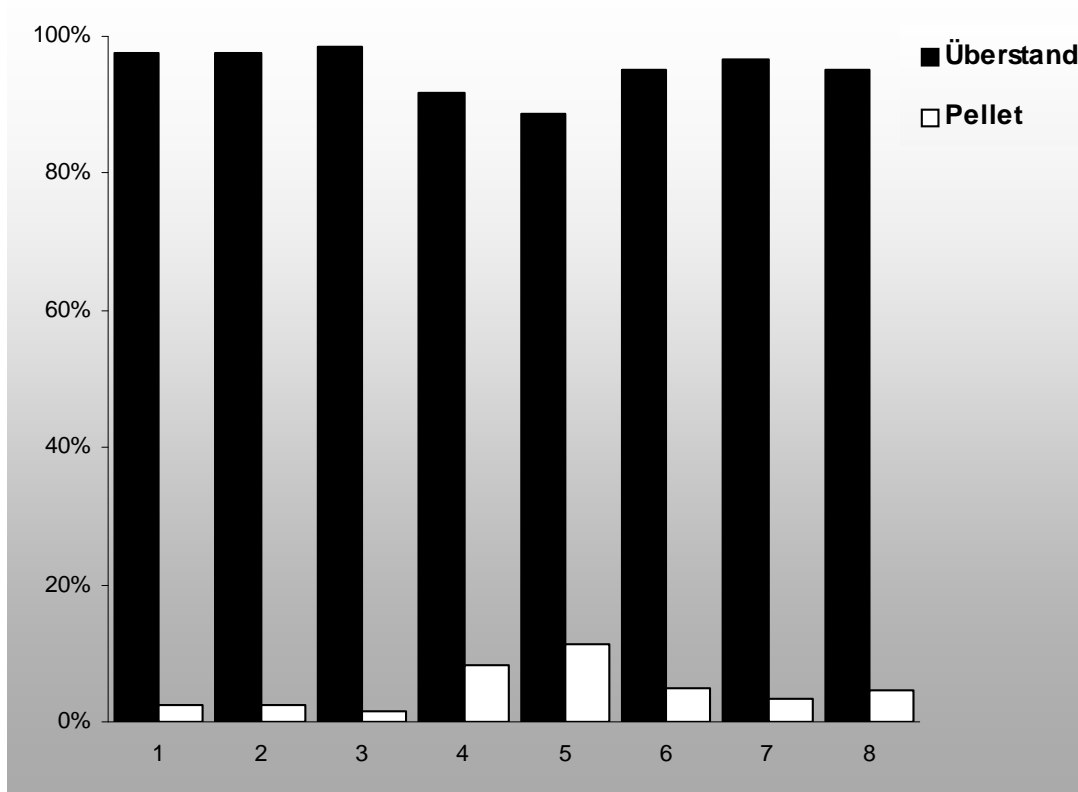
Zellkulturüberstand und im Plasma NB1-Proteine vorhanden. Es zeigt sich, dass die vorangegangene Depletion mit Sepharose A spezifisch für NB1 war und dass das so gewonnene Protein das gleiche Molekulargewicht besitzt wie das zelluläre NB1. Ob es sich bei dem aus dem Plasma depletierten Protein allerdings wirklich um eine lösliche Form von NB1 handelt, kann so noch nicht beantwortet werden, da das Unterscheidungsmerkmal zwischen einer zellulären und einer löslichen Form, das Vorhandensein bzw. Fehlen eines GPI-Ankers, sich nicht durch unterschiedliche Molekulargewichte darstellen lässt (Wilhelm et al., 1999).



**Abb. 11:** Immunpräzipitation des NB1-Proteins aus verschiedenen Quellen unter nicht reduzierten Bedingungen. Spur 1: Plasma einer Person mit 8 % NB1-positiver Granulozyten. Spur 2: Plasma einer Person mit 75 % NB1-positiver Granulozyten. Spur 3: Überstand aus einer Kultur NB1-transfizierter CHO-Zellen. Spur 4: Granulozytenlysat.

### 3.6.3 Nachweis durch Ultrazentrifugation

Um zu überprüfen, ob das im Plasma gefundene NB1 tatsächlich als lösliche Form vorliegt oder als membran- bzw. zellpartikelständiges Protein, wurden die Plasmen von 8 Testpersonen ultrazentrifugiert. Dabei wurden jeweils 6 ml Plasma bei 4°C und 160.000 g für 60 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vom Pellet getrennt und beide Fraktionen mittels ELISA auf ihren NB1-Gehalt hin überprüft. Zuletzt wurde der jeweilige Anteil beider Fraktionen am Gesamtgehalt berechnet. Abb. 12 zeigt die prozentualen Anteile an NB1-Protein beider Fraktionen bei den 8 Testpersonen. Bis auf zwei Ausnahmen lag der Anteil an NB1 im Überstand bei über 95 % (Mittelwert  $95,1 \pm 3,3$  %), die Werte der zwei Ausnahmen mit 92 bzw. 88 % nur geringgradig niedriger. Im Pellet, in dem membran- und zellpartikelständiges NB1 zu erwarten ist, lag dagegen nur ein sehr geringer Anteil an NB1 vor (Mittelwert  $4,9 \pm 3,3$  %).



**Abb. 12:** Ultrazentrifugation von Plasma von 8 verschiedenen Personen. Die Proben wurden 60 min bei 4°C und 160.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden Überstand und Pellet separiert und auf ihren NB1-Gehalt hin mittels ELISA überprüft. Y-Achse beschreibt den relativen Anteil (%) im Überstand bzw. Pellet am gesamten NB1-Gehalt.

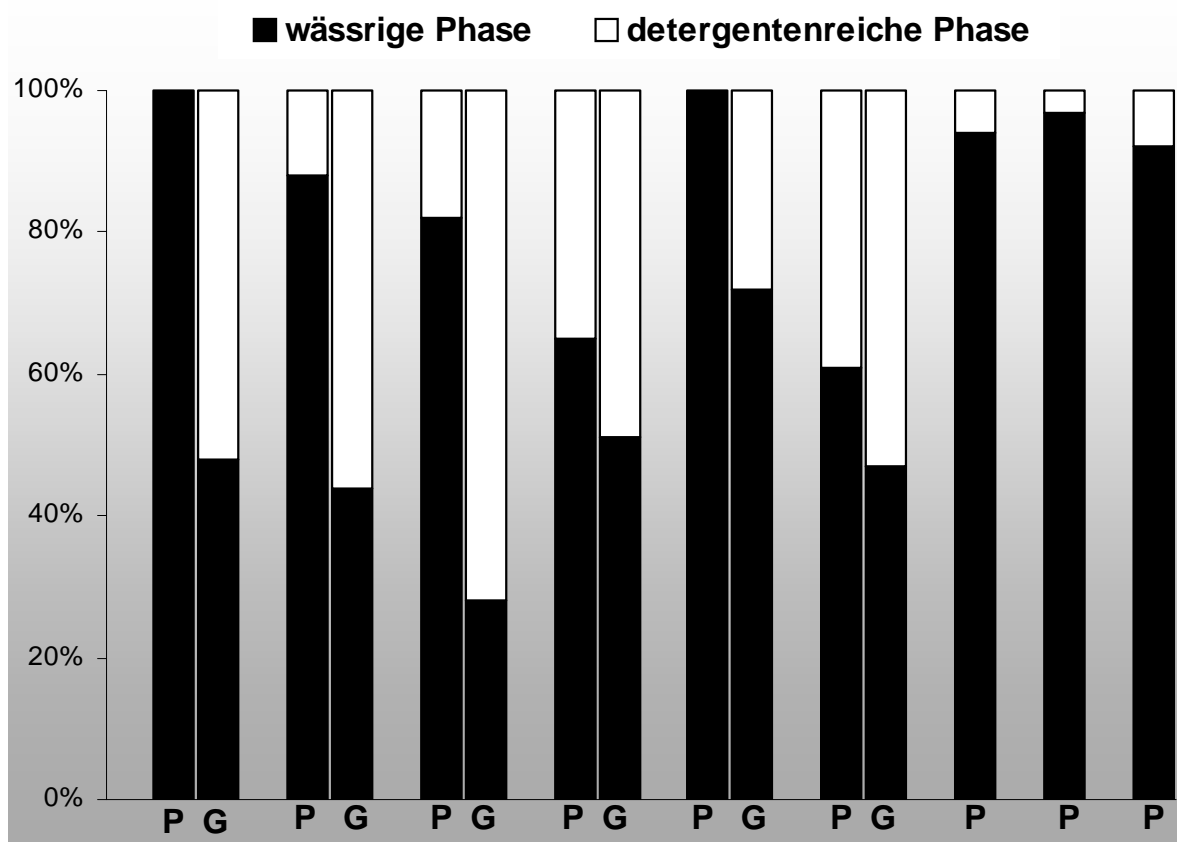
### 3.6.4 Biochemischer Nachweis durch Triton X-114-Trennung

Um zu zeigen, dass es sich bei dem im Plasma nachgewiesenen NB1 um eine echte lösliche Form handelt, welche aktiv von ihrem GPI-Anker auf der Zelloberfläche abgespalten wird, wurde das im Plasma gefundene NB1 auf seine lipophilen bzw. hydrophilen Eigenschaften untersucht. Dies erfolgte mit einer Phasen-Separation durch Triton X-114. Lösungen mit Triton X-114 weisen bei Temperaturen um 4°C einen homogenen Charakter auf. Werden solche Lösungen allerdings auf mindestens 20°C erwärmt, trennt sich das homogene Gemisch in eine wässrige und eine detergentenreiche Phase. Würde es sich bei den im Plasma gefundenen NB1-Proteinen um Granulozytenartefakte handeln, also um Proteine in Kombination mit intakten GPI-Ankern, wäre der Großteil der NB1-Moleküle aufgrund der lipophilen Anteile des GPI-Ankers in der detergentenreichen Phase zu finden. Umgekehrt zeigt ein Vorhandensein von NB1 in der wässrigen Phase der Triton X-114-Lösung an, dass die gefundenen Proteine einen hydrophilen Charakter aufweisen, was gegen eine Anwesenheit des GPI-Ankers und für eine echte lösliche Form von NB1 spricht. Daher wurden Plasmen von 9 Personen 1:1 mit eiskalter Triton X-114-Lösung versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Lösungen auf 37°C erwärmt und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Messung des NB1-Gehalts in den wässrigen und detergentenreichen Lösungen im ELISA. Zur Kontrolle wurden von 6 Personen Granulozytenlysate ebenfalls mit Triton X-114-Lösungen versetzt und das Verhältnis des NB1-Gehalts in der wässrigen Phase zum NB1-Gehalt in der detergentenreichen Phase berechnet (Abb. 13).

Im Plasma ist der größte Anteil an NB1 in den wässrigen Lösungen zu finden ( $86,6 \pm 14,6 \%$ ). Im Mittel betrug der NB1-Anteil in den detergentenreichen Lösungen  $13,4 \pm 12,6 \%$ . In 6 von 9 Fällen betrug der Anteil in der wässrigen Phase mindestens 85 %, in zwei Fällen sogar 100 %. In keinem einzigen Fall war der NB1-Gehalt in der detergentenreichen Phase größer als in der wässrigen Phase. Vergleicht man bei den jeweiligen Personen die Verteilung mit der des Granulozytenlysats, so weist hier die wässrige Phase mit  $48,3 \pm 14,2 \%$  einen viel geringeren NB1-Anteil auf als die Plasmen. In keinem Fall ist der NB1-Anteil in der wässrigen Phase im Lysat höher als im Plasma.

Somit hat sich gezeigt, dass es sich bei dem überwiegenden Anteil an NB1-Protein, welches im Plasma gefunden wird, um eine lösliche Form ohne GPI-Anker handelt. Umgekehrt verhält es sich bei den Granulozytenlysaten: Hier befindet sich der

größere Anteil in der detergentenreichen Phase, was für das Vorhandensein lipophiler Anteile, in diesem Fall der GPI-Anker, spricht.

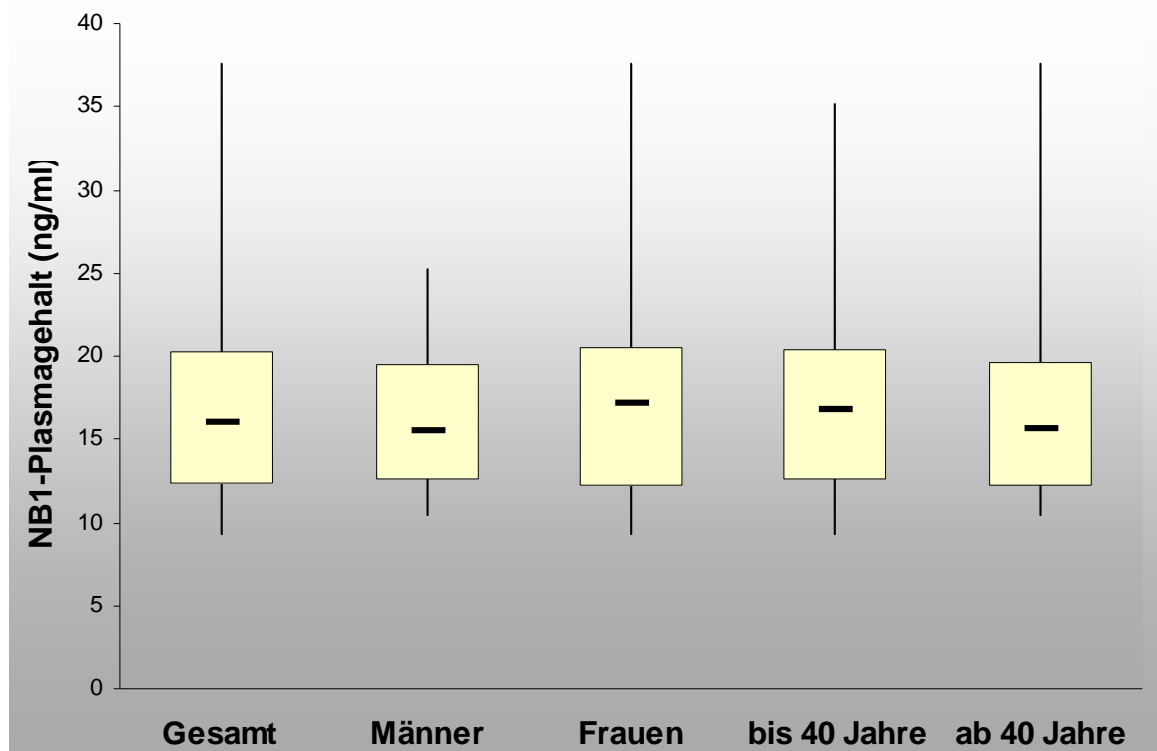


**Abb. 13:** Phasenseparation mit Triton X-114 bei neun Testpersonen. Plasma (P) wurde 1:1 mit eiskalter Triton X-114-Lösung versetzt, inkubiert, auf 37°C erwärmt und zentrifugiert. Anschließend wurde der NB1-Gehalt in der wässrigen und detergentenreichen Phase mittels ELISA gemessen und der jeweilige Anteil (%) bestimmt. Bei sechs Personen wurde zur Kontrolle eine Phasenseparation mit Granulozytenlysats (G) durchgeführt.

### 3.6.5 Quantitative Bestimmung des NB1-Plasmagehalts

Da durch die oben beschriebenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass eine lösliche Form des granulozytären Antigens NB1 existiert, konnte nun der NB1-Plasmagehalt quantitativ bestimmt werden. Dies erfolgte ebenfalls mit der oben beschriebenen Standardkurve und dem ELISA-Testsystem. Zunächst wurden die Extinktionswerte an NB1 im Plasma bei insgesamt 34 Personen im Doppelansatz bestimmt. Anschließend erfolgte die Umrechnung der Absorptionswerte mit Hilfe der Standardkurve in die entsprechenden Proteinkonzentrationen. Das Ergebnis ist in Abb. 14 dargestellt. Der errechnete NB1-Plasmagehalt erreichte Werte zwischen 9,3

– 37,6 ng/ml mit einem Medianwert von 16,1 ng/ml. Der niedrigste ermittelte Absorptionswert (OD = 0,44) übersteigt den mittleren Absorptionswert der Negativkontrollen der Standardkurve (OD = 0,16) fast um das Dreifache. Somit lagen sämtliche Werte im linearen Messbereich der Standardkurve. Vergleicht man die Plasmakonzentrationen von Frauen mit denen der Männer, so zeigt sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied. Auch das Alter der Personen hat keinen Einfluß auf die Höhe des Plasmagehalts an NB1.

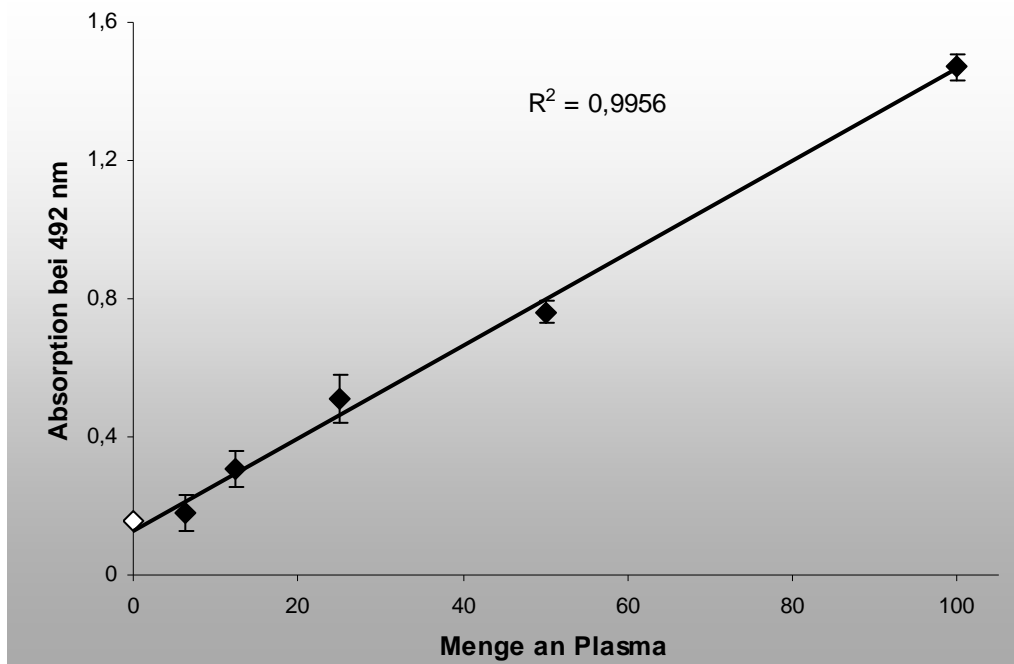


**Abb. 14:** NB1-Plasmagehalt (ng/ml) der 34 Testpersonen bzw. Unterteilung des Kollektivs anhand des Geschlechts und des Alters. Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert.

Zur Überprüfung der Spezifität der quantitativen Bestimmung des Plasmagehalts wurden zur Kontrolle die Plasmen von 29 der 34 Personen in einem ELISA gemessen, in dem der Anti-NB1-Ak MEM166 gegen Maus-IgG ausgetauscht wurde (s. Kap. 3 Material und Methoden). Während die Absorptionswerte mit MEM166 einen medianen Absorptionswert von OD = 0,91 aufweisen, zeigt sich bei der Verwendung von Maus-IgG ein Absinken des Medianwerts auf OD = 0,09, was dem gleichen Absorptionswert der dazugehörigen Negativkontrolle (100 µl PBS) entspricht.



Um auszuschließen, dass es durch andere Substanzen im Plasma, beispielsweise Fette, zu einer Verfälschung einzelner Messergebnisse im ELISA kommen kann, wurde die Spezifität anhand einer Verdünnungsreihe überprüft. Dabei wurden von einer Plasmaprobe fünf verschiedene Verdünnungsstufen (von 6,25 – 100 µl pro Vertiefung) im ELISA gemessen und deren Extinktionswerte grafisch dargestellt (Abb. 15). Es zeigt sich ein direkter linearer Zusammenhang zwischen den einzelnen Messwerten (Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,9956$ ). Dies deutet darauf hin, dass die ermittelten Absorptionswerte direkt von der Menge an eingesetztem Plasma und folglich von der Menge an vorhandenem, löslichen NB1 abhängen und nicht durch andere Substanzen beeinflusst werden.



**Abb. 15:** Verdünnungsreihe des NB1-Gehalts im Plasma. Plasma wurde in verschiedenen Konzentrationen auf seinen NB1-Gehalt hin im ELISA überprüft. Y-Achse stellt die ermittelten Absorptionswerte bei 492 nm (Mittelwert +/- SD), die X-Achse die eingesetzten Plasmamengen in µl dar.

### 3.6.6 Vergleich von löslichen und zellulären NB1

Expression <sup>1</sup>					
	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Minimum	Maximum
< 40 %	14,1	12,1	17,9	11,6	26,2
41-60 %	13,1	12,2	18,9	9,3	37,6
> 61 %	19,5	15,5	21,0	10,4	35,2

Oberflächenkonzentration <sup>2</sup>					
	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Minimum	Maximum
< 26 x 10 <sup>3</sup>	13,6	11,8	16,8	9,3	37,6
26-45 x 10 <sup>3</sup>	18,9	14,1	18,9	11,7	35,2
> 45 x 10 <sup>3</sup>	19,6	15,9	19,6	12,0	26,2

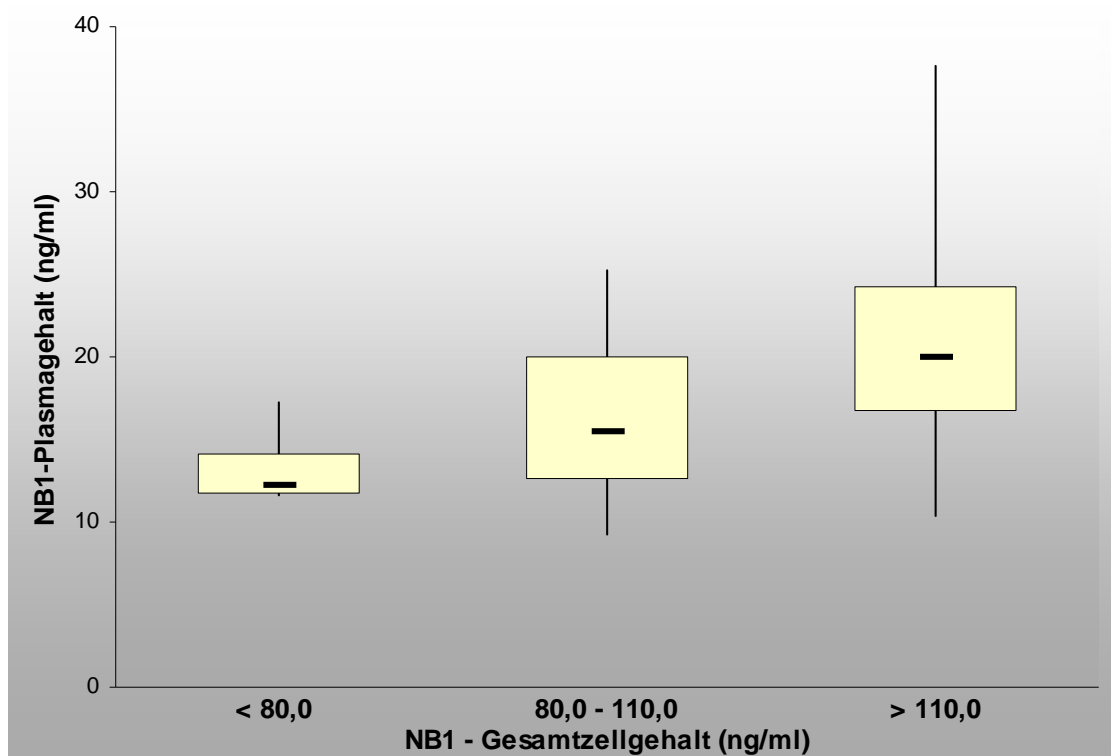
Gesamtoberflächenmenge <sup>3</sup>					
	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Minimum	Maximum
< 1000	12,2	11,8	14,1	9,3	25,2
1000-2000	15,5	12,6	18,9	10,4	37,6
> 2000	19,8	17,5	20,7	12,2	35,2

**Tab. 4:** Beziehung zwischen zellulären (n=94) und löslichen Gehalt an NB1 (n=30). Werte angegeben als Medianwert, Unteres Quartil (=25 % Interquartilbereich), Oberes Quartil (=75 % Interquartilbereich), Minimal- und Maximalwert des NB1-Plasmagehalts (ng/ml) jeder Gruppe. <sup>1</sup>Größe der NB1-positiven Subpopulation. <sup>2</sup>Durchschnittliche Zahl an NB1-Oberflächenmolekülen pro NB1-positiver Zelle. <sup>3</sup>Gesamtoberflächenmenge, entspricht der NB1-Expression multipliziert mit der Oberflächenkonzentration.

Vergleicht man bei den einzelnen Personen die Menge an löslichen NB1 mit der Menge, welche sich auf der Zelloberfläche befindet, so zeigen sich kleine, jedoch nicht signifikante Gemeinsamkeiten (Tab. 4). Zwar weisen die Personen, die einen hohen prozentualen Anteil NB1-positiver Zellen oder eine hohe Oberflächenkonzentration besitzen, auch einen hohen Plasmagehalt an NB1 auf, jedoch sind die Unterschiede oder auch die Anzahl der getesteten Personen zu gering um statistisch signifikant zu sein. Allerdings deutet sich ein Zusammenhang zwischen der NB1-Gesamtoberflächenmenge und dem Plasmagehalt an. Je höher

die Gesamtoberflächenmenge einer Person ist, desto höher scheint der Gehalt an löslichem NB1 zu sein. So liegt z.B. der 25 %-Interquartilbereich der Gruppe mit den höchsten Gesamtoberflächenmengen höher als der 75 %-Interquartilbereich der Gruppe mit den niedrigsten Mengen an oberflächlichem NB1.

Ein Zusammenhang zwischen dem NB1-Gehalt auf zellulärer Ebene und dem löslichen Anteil zeigt sich jedoch bei dem Vergleich der Plasmawerte mit dem NB1-Gesamtzellgehalt, also dem Gehalt, der sich sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär befindet (Abb. 16). Je höher der NB1-Gesamtzellgehalt liegt, desto größer ist der NB1-Plasmagehalt. Der Unterschied sowohl zwischen der Gruppe mit Werten  $> 110$  ng/ml gegenüber den übrigen Personen, als auch der Unterschied zwischen den Personen mit Werten  $< 80,0$  ng/ml und den Personen  $> 110$  ng/ml, ist mit  $p = 0,018$  bzw.  $p = 0,0038$  statistisch signifikant.



**Abb. 16:** Beziehung zwischen dem NB1-Gesamtzellgehalt (ng/ml) und dem NB1-Plasmagehalt (ng/ml). X-Achse: Die Testpersonen wurden anhand ihrer zellulären NB1-Konzentration in drei Gruppen eingeteilt und deren NB1-Plasmakonzentrationen (ng/ml) als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert dargestellt (n=24).

### **3.6.7 NB1 im Urin**

Aufgrund des hydrophilen Charakters der löslichen Form von NB1 ist zu erwarten, dass diese über die Niere ausgeschieden wird und anschließend im Urin zu finden ist. Diese Beobachtung wurde bereits bei uPAR, CD87 gemacht (Sidenius et al., 2000), einem Protein, welches die größte strukturelle Ähnlichkeit zu CD177 aufweist. Weiterhin wäre das Auffinden von NB1-Proteinen im Urin ein weiterer Beweis für die Existenz einer löslichen Form. Daher wurden von sechs Testpersonen Urinproben im oben beschriebenen ELISA untersucht und die ermittelten Absorptionswerte wurden mit Hilfe der Standardkurve in entsprechende Proteinkonzentrationen umgerechnet. Eine der fünf Testpersonen hat im Rahmen einer Immunisierung durch eine Schwangerschaft Anti-NB1-Antikörper ausgebildet und ist daher immunologisch als NB1-negativ anzusehen. Während bei allen fünf „NB1-positiven“ Personen das Protein im Urin nachzuweisen war (Werte zwischen 3,3 – 8,3 ng/ml, Mittelwert  $5,78 \pm 2,01$  ng/ml), lag der Absorptionswert der „NB1-negativen“ Person unter dem der Negativkontrolle. Somit konnte hier kein NB1-Protein nachgewiesen werden.

### **3.7 Untersuchungen zur NB1-Expression nach Zellstimulation**

Durch zahlreiche Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es nach einer Aktivierung bzw. Stimulation neutrophiler Granulozyten zu einer Veränderung in der Expression verschiedener Proteine auf deren Oberfläche kommen kann (s. Kap. 1.3.4). Dies wurde auch für die Expression von NB1 nachgewiesen, allerdings mit teilweise unterschiedlichen Ergebnissen. Während bei in vitro Experimenten durch fMLP-Stimulation eine Erhöhung der NB1-Oberflächenkonzentration bei gleichzeitig konstanter NB1-Expression beobachtet wurde (Skubitz et al., 1991; Goldschmeding et al., 1992), konnte durch in vivo Untersuchungen mit GCSF-Aktivierung eine Erhöhung der NB1-Expression festgestellt werden (Stroncek et al., 1998b). Daher wurden sowohl in vitro als auch in vivo Untersuchungen zur Expression von NB1 (sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche) durchgeführt.

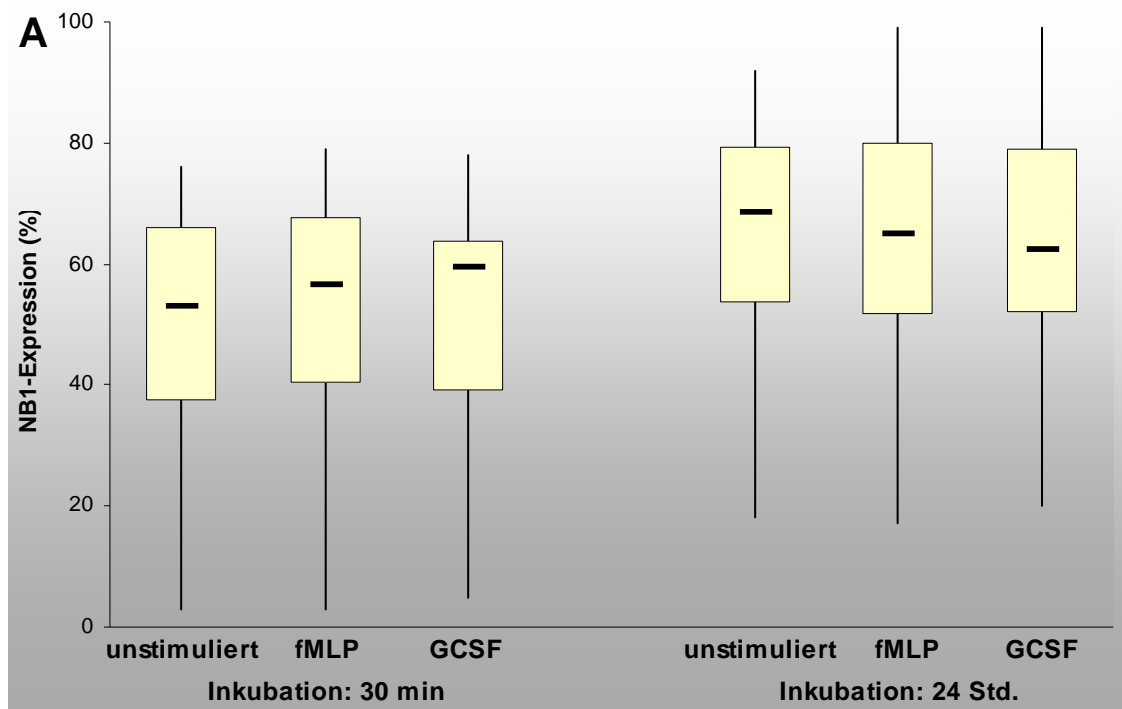
### 3.7.1 In vitro Untersuchungen

Jeweils  $10^7$  Granulozyten wurden mit fMLP, GCSF oder ohne Stimulation für 30 min bzw. 24 Std. bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Teilweise wurden zusätzliche Ansätze mit Östrogen inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend zentrifugiert, so dass eine Trennung der Zellen vom Überstand möglich war. Während der Überstand mittels ELISA auf seinen NB1-Gehalt hin untersucht wurde, erfolgte die Bestimmung der NB1-Expression und der Oberflächenkonzentration am Durchflusszytometer.

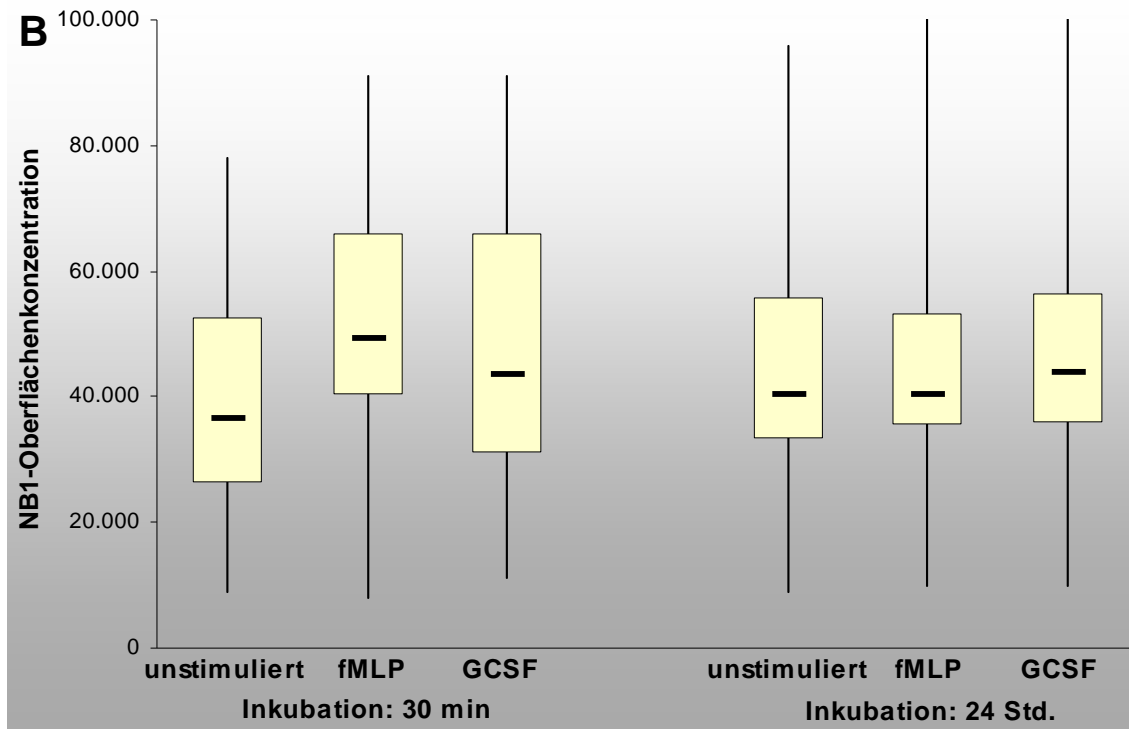
Abb. 17 A zeigt das Ergebnis der NB1-Expression, also dem Anteil an NB1-positiven Granulozyten. Wie zu erwarten war, kommt es nach 30 min durch eine Stimulation mit fMLP oder GCSF zu keiner Erhöhung des Anteils an positiven Zellen. Werden die Zellen jedoch für 24 Std. im Zellkulturbrutschrank bei 37°C inkubiert, so kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des NB1-positiven Anteils. Diese Erhöhung ist sowohl bei einer Stimulation mit fMLP ( $p = 0,027$ ) als auch mit GCSF ( $p = 0,027$ ) zu beobachten. Zusätzlich zeigen auch die unstimulierten Ansätze eine signifikante Erhöhung der NB1-Expression ( $p = 0,018$ ) im Vergleich zu den Werten nach 30 min. Der Anteil der NB1-positiven Subpopulation erhöhte sich nach 24 Std. im Mittel um 29 %. Bei einer Stimulation mit Östrogen war in keinem Fall eine Veränderung zu beobachten.

Die Veränderungen hinsichtlich der NB1-Oberflächenkonzentration werden in Abb. 17 B deutlich. Bei der Untersuchung von insgesamt 30 Personen zeigte sich eine signifikante Erhöhung ( $p = 0,016$ ) der Anzahl an Oberflächenmolekülen durch eine Aktivierung mit fMLP nach 30 min Inkubation. Dabei erhöhte sich die Oberflächenkonzentration im Mittel um 33 %. Zwar kommt es durch die Inkubation mit GCSF im Mittel auch zu einer Erhöhung der Oberflächenkonzentration, jedoch ist der Unterschied zu den unstimulierten Ansätzen, zumindest bei einer Gruppengröße von 30 Testpersonen, nicht statistisch signifikant ( $p = 0,08$ ). Werden die Zellen 24 Std. mit fMLP bzw. GCSF inkubiert, so zeigt sich keine Erhöhung der Oberflächenkonzentration. Auch die Werte nach einer fMLP-Stimulation sind, obwohl es nach 30 min zu einem Anstieg gekommen war, wieder auf dem gleichen Level wie nach 30 min Inkubationszeit ohne Zusatz. Zeigte sich bei der NB1-Expression noch ein Unterschied zwischen den unstimulierten Gruppen nach 30 min bzw. 24 Std., so ist bei der Oberflächenkonzentration kein Unterschied festzustellen. Eine Stimulation

der Zellen mit Östrogen erbrachte keine Veränderungen in der NB1-Oberflächenkonzentration.



**Abb. 17 A:** Relativer Anteil NB1-positiver Granulozyten (%) nach einer Inkubationszeit von 30 min bzw. 24 Std. mit fMLP, GCSF oder ohne Stimulans bei 30 Testpersonen. Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert (n=30).



**Abb. 17 B:** Mittlere NB1-Oberflächenkonzentration (Anzahl der Moleküle pro Zelle) der positiven Subpopulation nach einer Inkubationszeit von 30 min bzw. 24 Std. mit fMLP, GCSF oder ohne Stimulans bei 30 Testpersonen. Darstellung als Boxplots mit Medianwert, 25 %- bzw. 75 % Interquartilbereich, Minimal- und Maximalwert (n=30).

### 3.7.2 In vivo Untersuchungen

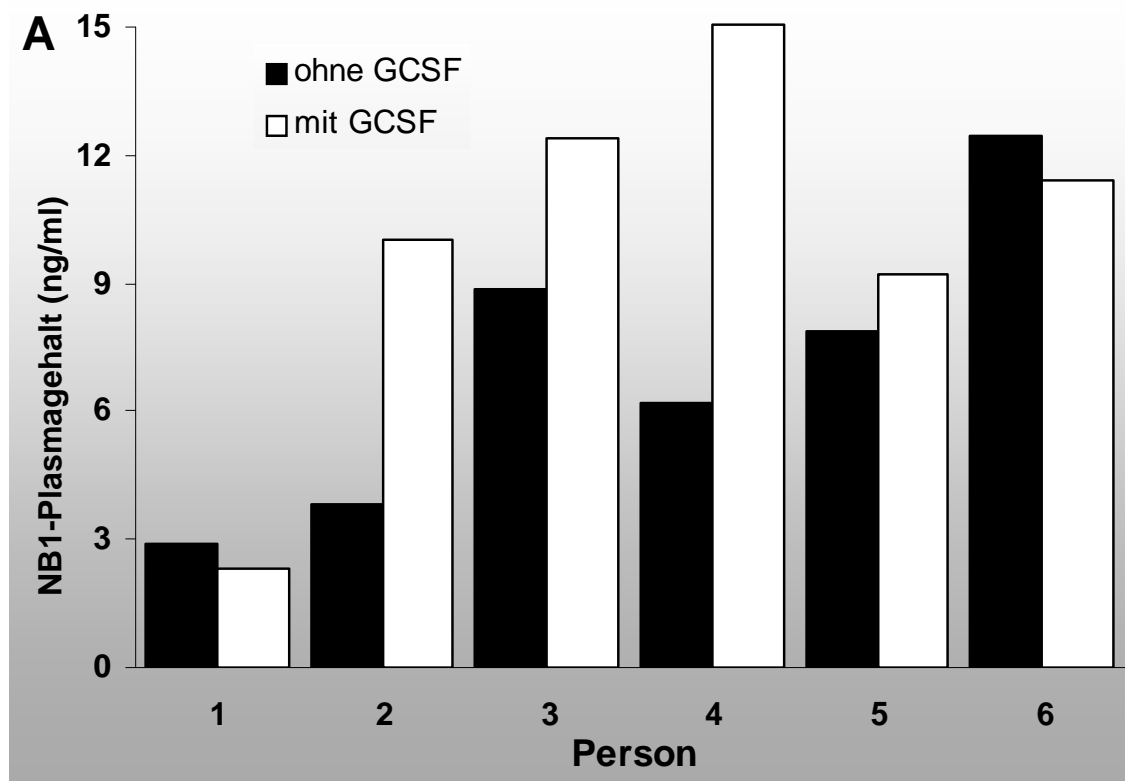
Für in vivo Studien wurden die Plasmen bzw. die Granulozyten von Personen verwendet, welche zwecks Granulozytenspende mit GCSF stimuliert wurden. Die Gewinnung der Plasmen und der Zellen erfolgte jeweils unmittelbar vor und einen Tag nach GCSF-Gabe.

Vergleicht man den NB1-Plasmagehalt vor bzw. nach der GCSF-Gabe, so zeigt sich in 4 von 6 Fällen ein deutlicher Anstieg des Plasmagehalts (Abb. 18 A). Die Absorptionswerte im ELISA von Person 1, einem Granulozytenspender mit einer NB1-Expression von 0 %, liegen nur unwesentlich höher als die der entsprechenden Negativkontrolle und wurden daher als „negativ“ betrachtet und in den statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt. Der Anstieg der Plasmawerte betrug zwischen 17 – 163 %, bei Person Nr. 6 lag der Abfall zwischen den beiden Messungen bei 19 %. Vergleicht man nun in diesem Zusammenhang den NB1-Gesamtgehalt vor bzw. nach einer Stimulation mit GCSF, so zeigt sich, im Gegensatz zum NB1-Gehalt im Plasma, kein Unterschied zwischen den beiden Messungen (Tab. 18 B). Bei allen

vier Personen sind die Werte nahezu identisch. Der maximale Unterschied betrug 4 %, was auch auf eine unspezifische Variation im Messergebnis zurückzuführen sein kann.

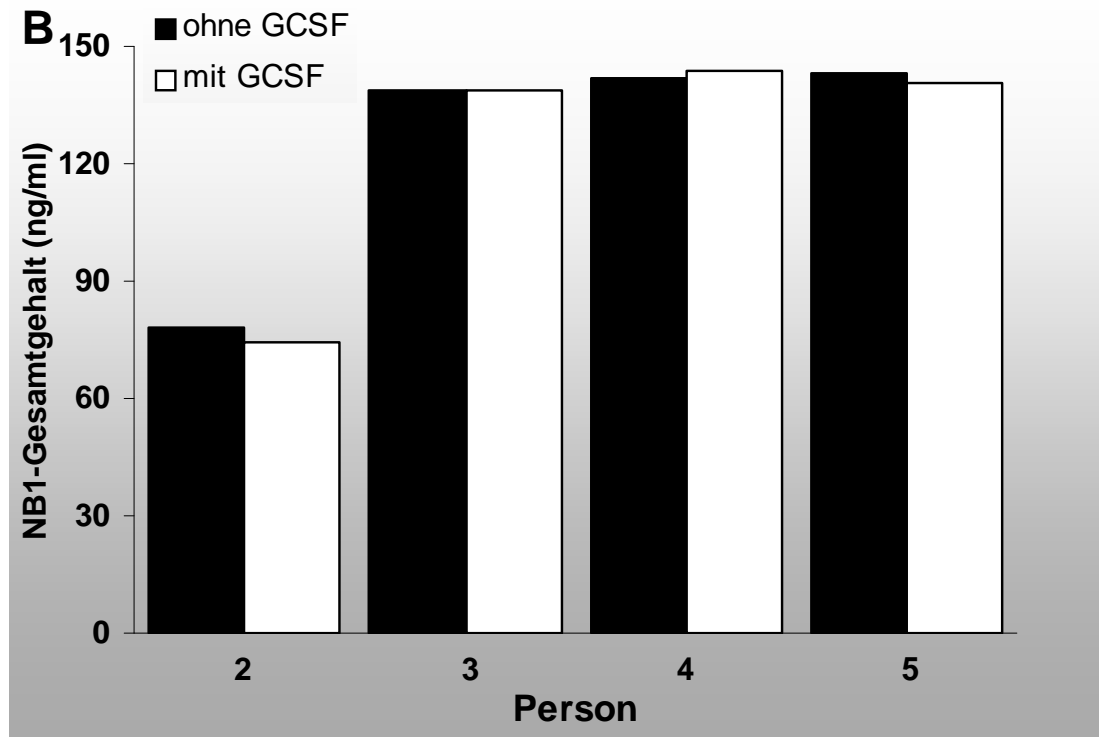
Neben dem NB1-Gesamtgehalt und dem Plasmagehalt wurde auch die Menge an NB1 im Urin nach der Stimulation mit GCSF gemessen. Dabei liegt der Mittelwert nach einer GCSF-Stimulation mit  $22,7 \pm 18,2$  ng/ml signifikant höher als bei Personen ohne GCSF-Stimulation ( $5,78 \pm 2,01$  ng/ml). Auch der niedrigste, nach einer GCSF-Stimulation gemessene Wert (9,7 ng/ml) ist höher als der größte Wert ohne Stimulation (8,3 ng/ml).

Fasst man die Untersuchungen zusammen, so zeigt sich, dass es nach einer Stimulation der Granulozyten zu einer relativ schnellen Zunahme der NB1-Oberflächenkonzentration verbunden mit einer Zunahme des NB1-Gehalts im Plasma und im Urin kommt. Eine Erhöhung des NB1-Gesamtgehalts konnte dagegen nicht beobachtet werden. Werden Granulozyten für mindestens 24 Std. inkubiert, erhöht sich, zumindest bei in vitro Untersuchungen, auch der Anteil an NB1-positiven Zellen.



**Abb. 18 A:** Vergleich des Plasmagehalts von NB1 (ng/ml) vor bzw. nach Stimulation mit GCSF bei 6 Granulozytenspendern.





**Abb. 18 B:** Vergleich des NB1-Gesamtgehalts (ng/ml) vor bzw. nach Stimulation mit GCSF bei 4 Granulozytenspendern.

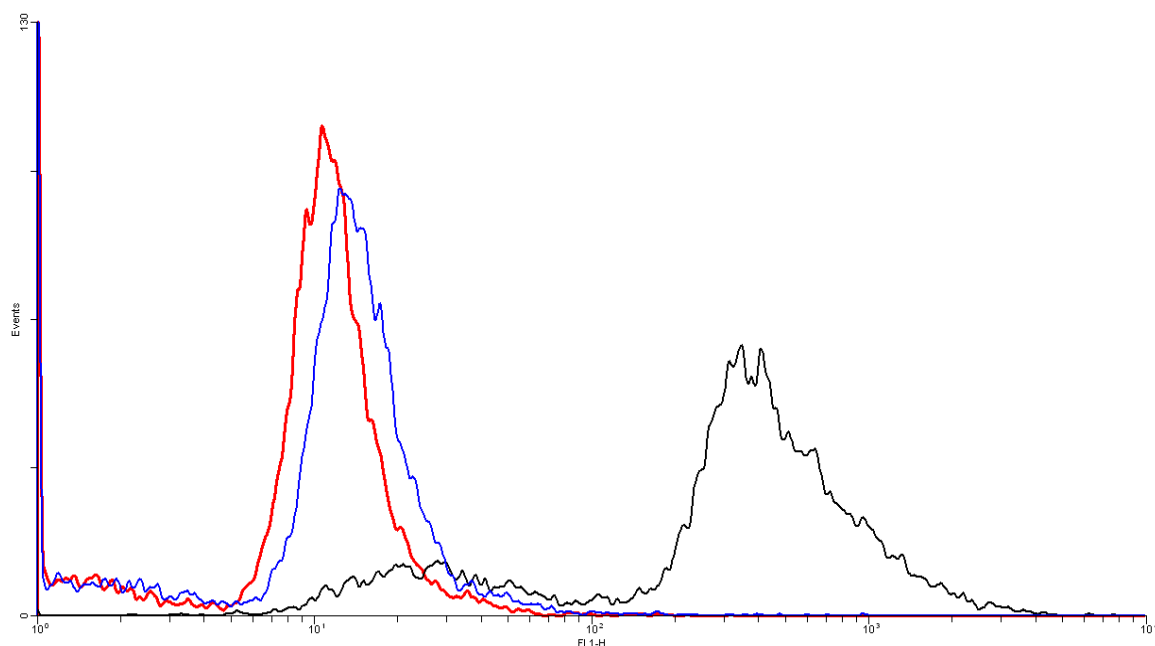
### 3.7.3 NB1 defiziente Subpopulation

Da es nach einer Inkubation von Granulozyten über 24 Std., unabhängig von einer Stimulation mit GCSF oder fMLP, zu einer Erhöhung des Anteils NB1-positiver Granulozyten kommt, wurde in diesem Zusammenhang die NB1-negative Subpopulation näher untersucht. Dazu wurden vor der Inkubation durch einen Zellsorter die NB1-negativen Zellen von den NB1-positiven Zellen isoliert. Nach einer Inkubation der negativen Zellen mit fMLP, GCSF oder ohne Zusatz für 24 Std. bei 37°C im Zellkulturbrutschrank, wurde anschließend der Anteil NB1-positiver Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. In zwei von vier Fällen, bedingt durch den bei der Zellsortierung verursachten „Stress“ und der damit verbundenen Aktivierung der Granulozyten, starben während der 24-stündigen Inkubation zu viele Zellen ab, um eine ausreichende Zellzahl für die Auswertung zur Verfügung zu haben. In den beiden anderen Fällen erwiesen sich nach der Inkubation 23 % bzw. 18 % der Granulozyten als NB1-positiv.

### 3.8 Funktionelle Untersuchungen zu NB1

#### 3.8.1 Oxidativer Burst

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß die Bindung von Antikörpern an das korrespondierende Antigen einen direkten Einfluss auf die Funktion der jeweiligen Zellen haben kann. So wurde unter anderem gezeigt, dass durch die Bindung von Anti-Plättchen-Antikörpern, über die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, eine Zerstörung der Thrombozyten bewirkt wird (Nardi et al., 2001). Ob es auch in Anwesenheit von Anti-NB1-Antikörpern zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen kommt, und somit zu einer Beeinflussung der granulozytären Funktion, sollte in folgenden Experimenten untersucht werden. Dazu wurden isolierte Granulozyten zunächst mit dem monoklonalen Antikörper MEM166, mit humanem Anti-NB1-Ak oder zur Negativkontrolle mit humanem bzw. Maus-IgG inkubiert und nachfolgend mit fMLP inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Hälfte der Ansätze zusätzlich mit DPI (Diphenyleniodonium) inkubiert. DPI ist ein spezifischer Inhibitor der NADP(H)-Oxidase, es bindet dabei an Flavin, einem Bestandteil von Cytochrom b (Cross & Jones, 1986; Fischer et al., 2002). Die Hemmwirkung von DPI erfolgt allerdings nur bei bereits aktivierten Granulozyten (O'Donnell et al., 1993). Nach Anfärbung der Zellen erfolgte die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und damit der Sauerstoffradikalbildung am Durchflusszytometer (Abb. 19).



**Abb. 19:** Produktion reaktiver Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten nach Inkubation mit MEM166 (schwarz), mit MEM166 und DPI (blau) und nach Inkubation mit Maus-IgG (rot).

Tab. 5 zeigt das Ergebnis der Messung am Durchflusszytometer als mittlere Fluoreszenzintensität. Es zeigt sich, dass es in Anwesenheit des monoklonalen Anti-NB1-Antikörpers MEM166 zu einer Produktion von Sauerstoffradikalen kommt (Mittelwert: MFI =  $200,7 \pm 164,8$ ). In Abwesenheit von MEM166 zeigt sich ein deutlich geringerer Wert (Mittelwert: MFI =  $16,1 \pm 4,7$ ). Die Hinzugabe von DPI verringert die Sauerstoffradikalbildung um 36 – 98 % (Mittelwert: 74 %).

In Anwesenheit von humanen Anti-NB1-Antikörpern kommt es ebenfalls zu einer Produktion von Sauerstoffradikalen, allerdings in geringerem Maße als bei der Anwesenheit von MEM166 (Mittelwert: MFI =  $48,7 \pm 21,4$  im Vergleich zur Negativkontrolle: MFI =  $17 \pm 4$ ).

Nr.	MEM166 ohne DPI	MEM166 mit DPI	mlgG	Anti-NB1	hlgG
1	191	27	25		
2	478	12	11		
3	194	18	13	39	14
4	77	49	16	83	14
5	30	11	12	21	16
6	48	25	17	42	21
7	158	23	22	36	15
8	464	13	14	71	14
9	166	17	15	49	25
Mittel-Wert	$200,7 \pm 164,8$	$21,7 \pm 11,8$	$16,1 \pm 4,7$	$48,7 \pm 21,4$	$17 \pm 4$

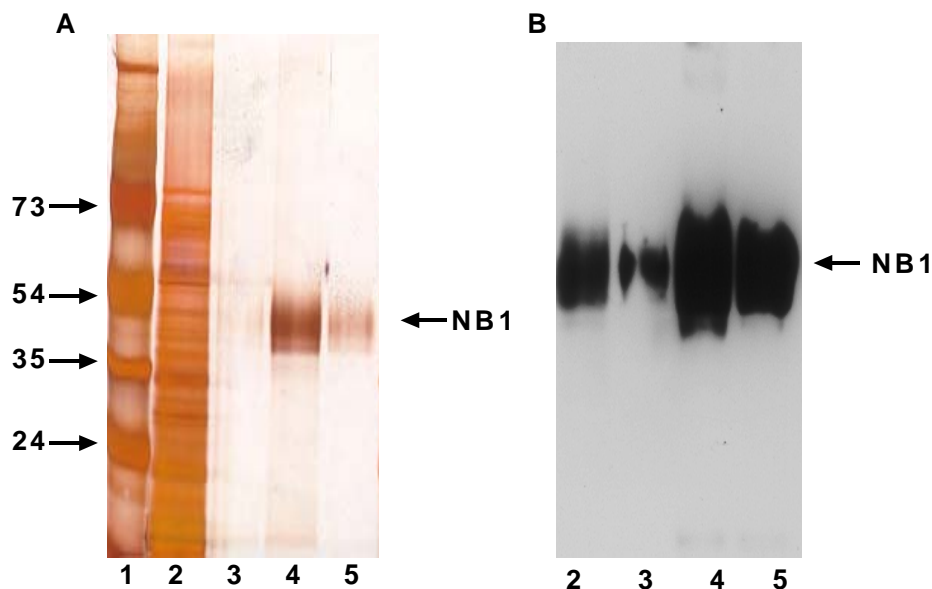
**Tab. 5:** Mittlere Fluoreszenz-Intensität am Durchflusszytometer bei neun Testpersonen. Folgende Ansätze wurden ausgewertet: Granulozyten + MEM166; Granulozyten + MEM166 + DPI; Granulozyten + Maus-IgG; Granulozyten + humanem Anti-NB1; Granulozyten + humanem IgG.

### 3.8.2 NB1–Counterrezeptor

Die Funktion des granulozytären Antigens NB1 ist weitgehend unbekannt. Bisherige Beobachtungen lassen nur Vermutungen zu. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse, dass NB1 zum einen nach G-CSF-Aktivierung auf der neutrophilen Oberfläche hochreguliert wird, zum anderen dass durch die Bindung von Anti-NB1-Antikörpern eine Produktion reaktiver Sauerstoffspezies stattfindet, lässt eine Teilnahme von NB1 an der durch die neutrophilen Granulozyten vermittelten unspezifischen Immunabwehr vermuten. Frühere Untersuchungen zeigen eine Beeinflussung der granulozytär-endothelialen Interaktion (Kap. 1.3.4), so dass ein möglicher Ligand von NB1 auf der Oberfläche von Endothelzellen zu suchen ist.

#### 3.8.2.1 Isolierung des NB1-Proteins mittels Immunaффinitätschromatographie

Für die weiteren funktionellen Untersuchungen wurde das NB1-Protein in isolierter Form benötigt. Daher wurden neutrophile Granulozyten lysiert und das NB1-Protein aus diesem Lysat mittels Immunaффinitätschromatographie isoliert. Als monoklonaler Antikörper gegen NB1 diente dabei 7D8. Der Erfolg der Isolierung und die Reinheit des Eluats wurden durch eine Silberfärbung und Immunoblot überprüft (Abb. 20). Anschließend erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung des Eluats.



**Abb. 20:** Silberfärbung (A) & Immunoblot (B) der NB1-Isolierung durch Immunaффinitäts-Chromatographie. Spur 1 zeigt den Molekulargewichtsstandard (kDa), Spur 2 das Granulozytenlysat und die Spuren 3 – 5 verschiedene Fraktionen des Eluats.

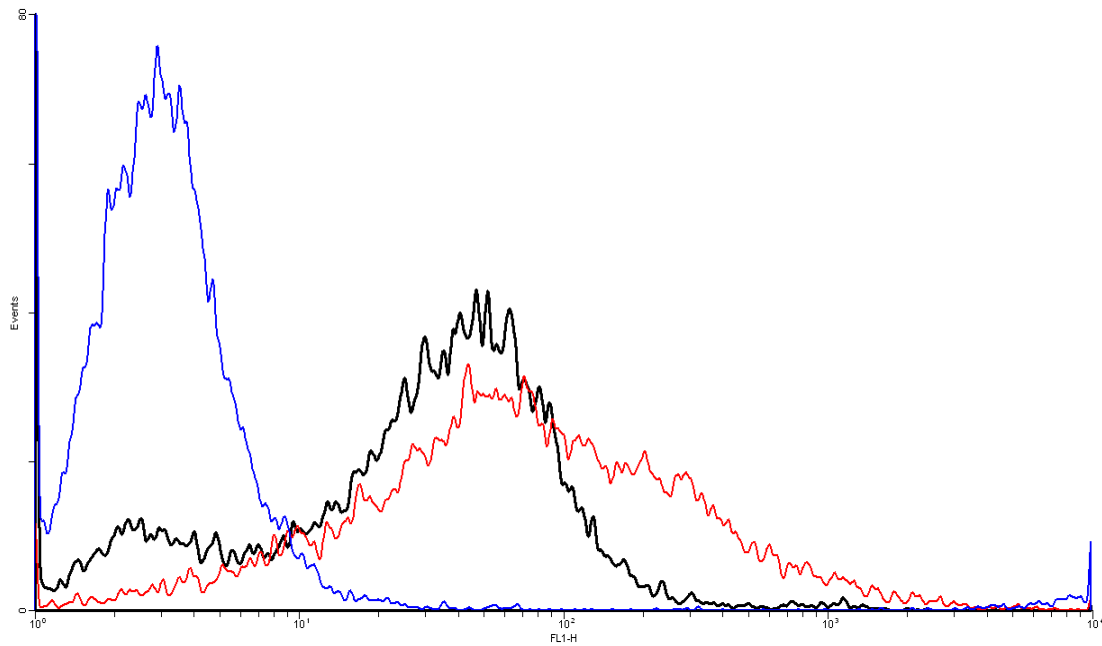
## **Interaktionsstudien mit Endothelzellen**

Da, wie bereits in Kap. 3.8.2 beschrieben wird, ein möglicher Ligand von NB1 auf der endothelialen Oberfläche vermutet wird, wurden zunächst Untersuchungen zur Bindung von NB1 an Endothelzellen allgemein durchgeführt. Die Überprüfung der Bindung erfolgte auf unterschiedliche Weise, zum einen durch durchflusszytometrische Analysen, zum anderen durch interzelluläre Bindungstests.

### **3.8.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen**

Um nachzuweisen, dass ein Partner des NB1-Proteins auf den Endothelzellen existiert, wurden kultivierte Endothelzellen zunächst für 4 Std. mit TNF $\alpha$  stimuliert. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen von der Petrischale, damit sie nachfolgend mit dem NB1-Protein für 30 min. bei 37°C inkubiert werden können. Nach weiteren Inkubationen mit einem NB1-spezifischen Ak und einem FITC-markierten RAM-Ak wurde eine mögliche Bindung des NB1-Moleküls an den Endothelzellen am Durchflusszytometer überprüft. Als Positivkontrolle wurde die homophile Bindung zwischen endothelialen PECAM-1-Molekülen und PECAM-1-Fc gewählt. Abb. 21 zeigt eine deutliche Bindungsaktivität zwischen den NB1-Molekülen und den Endothelzellen (schwarze Kurve). Die mittlere Fluoreszenzintensität liegt mit MFI = 51 nahe dem Bereich der homophilen Bindung von PECAM-1 mit MFI = 69 (rote Kurve). Wird anstelle des Anti-NB1-Ak 7D8 ein Maus-IgG eingesetzt (blaue Kurve), ist keine Bindung festzustellen (MFI = 19). Weiterhin kommt es zu keinen Bindungsaktivitäten, wenn anstelle des NB1-Proteins und der nachfolgenden Zugabe des mAk 7D8 nur der NB1-spezifische Antikörper zu den Endothelzellen gegeben wird (MFI = 24, nicht dargestellt).

Zur weiteren Charakterisierung des potentiellen endothelialen NB1-Liganden sollte überprüft werden, ob NB1 auch an unstimulierten Endothelzellen bindet oder ob der Partner erst nach einer Aktivierung auf der Endothelzelloberfläche exprimiert wird. Dazu wurde das oben beschriebene Experiment benutzt, jedoch ohne eine vorherige Stimulation der Endothelzellen mit TNF $\alpha$ . Wie in Abb. 22 zu sehen ist, erfolgt die Bindung von NB1 am Endothel mit gleicher Intensität wie an stimulierten Zellen. Somit muss es sich bei dem gesuchten Liganden um ein Protein handeln, welches konstitutiv auf der Zelloberfläche vorhanden ist und nicht erst durch Zellstimulation exprimiert wird.

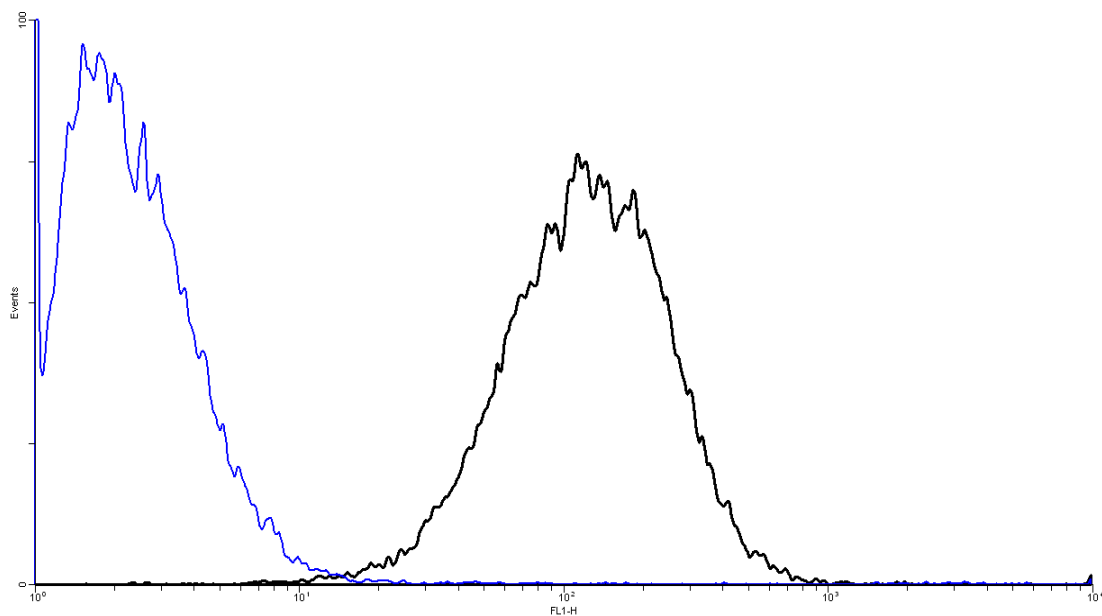


**Abb. 21:** Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des NB1-Moleküls an TNF $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen. Die X-Achse stellt die mittlere Fluoreszenzintensität, die Y-Achse die relative Zellzahl dar.

**Schwarze Kurve:** Endothelzellen + NB1 + 7D8

**Blaue Kurve:** Endothelzellen + NB1 + Maus-IgG

**Rote Kurve :** Endothelzellen + PECAM-1 + Gi18



**Abb. 22:** Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des NB1-Moleküls an unstimulierten Endothelzellen. Die X-Achse stellt die mittlere Fluoreszenzintensität, die Y-Achse die relative Zellzahl dar.

**Schwarze Kurve:** Endothelzellen + NB1 + 7D8

**Blaue Kurve:** Endothelzellen + NB1 + Maus-IgG

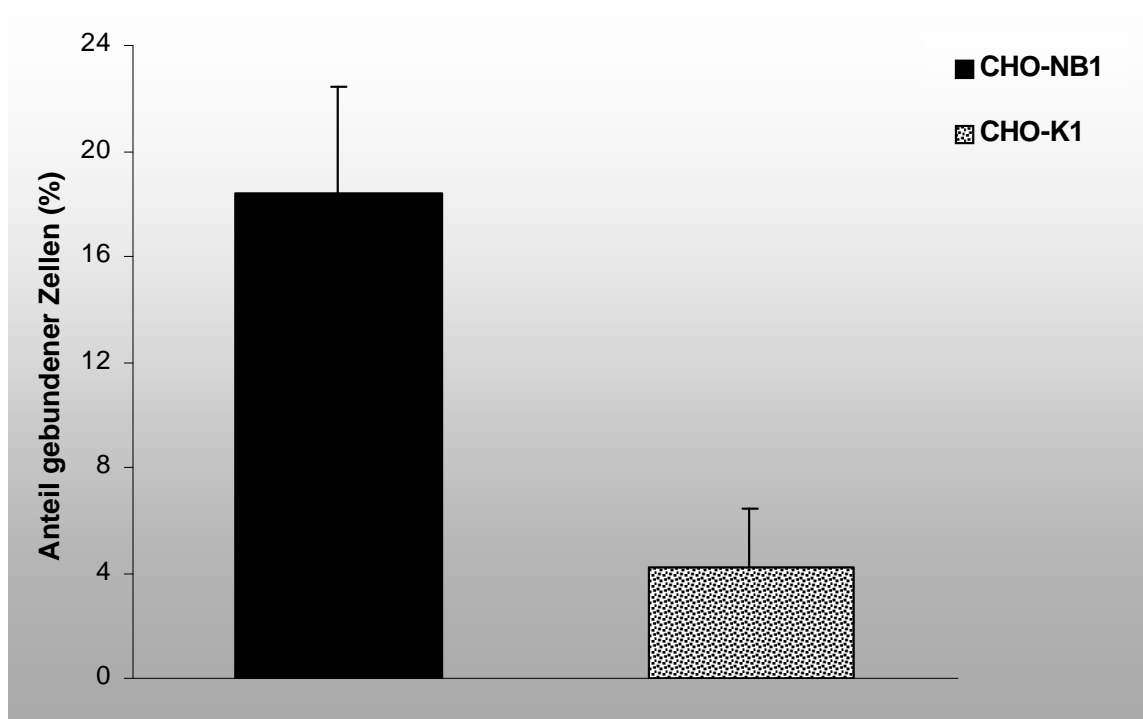
### 3.8.2.3 Zell-Adhäsion

Um die in den durchflusszytometrischen Untersuchungen erzielten Ergebnisse zu verifizieren, erfolgte nun die Ermittlung einer möglichen Bindung von NB1 an Endothelzellen durch interzelluläre Bindungstests. Dafür standen verschiedene Methoden zur Verfügung, zum einen Adhäsionstests mit nachfolgender Kristall-Violett-Anfärbung, zum anderen mit vorausgehender Fluoreszenzmarkierung (s. Kap. 2.2.4.10 und 2.2.4.11).

Für die Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen CHO-NB1-Zellen und Endothelzellen durch Kristall-Violett-Anfärbung wurden jeweils  $10^5$  Endothelzellen in die Vertiefungen einer Flachbodenplatte gegeben und über Nacht inkubiert. Nach der Blockierung mit BSA (3 %) erfolgt die Zugabe von CHO-NB1- bzw. untransfizierten CHO-Zellen. Nach weiteren Inkubationen mit Fixierungs- und Färbelösung erfolgte die Auswertung der Extinktion am Plattenphotometer bei einem Absorptionsmaximum von 592 nm.

Werden Endothelzellen zusammen mit untransfizierten CHO-Zellen inkubiert, ergibt sich eine mittlere Extinktion von  $OD = 1,93 \pm 0,221$ , was nur unwesentlich höher liegt als die Extinktionswerte der Endothelzellen allein ( $OD = 1,44 \pm 0,103$ ). Werden hingegen die Endothelzellen mit CHO-NB1-Zellen inkubiert, liegt der mittlere Extinktionswert bei  $OD = 3,26 \pm 0,18$ . Das NB1-Protein geht somit eine Bindung mit Endothelzellen ein.

Bei den Untersuchungen mit Fluoreszenzmarkierung werden ebenfalls zunächst je  $10^5$  Endothelzellen in die Vertiefungen einer Flachbodenplatte gegeben und über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgt am nächsten Tag nach vorherigem Waschen eine Blockierung der Platte und eine Zugabe von jeweils  $10^5$  CHO-K1- bzw. CHO-NB1-Zellen, welche zuvor mit BCECF angefärbt wurden. Nach der Inkubation erfolgte die 1. Messung der Fluoreszenzintensität, nach anschließendem zweimaligen Waschen die 2. Messung. Wie in Abb. 23 dargestellt ist, weisen CHO-NB1-Zellen ein vielfach größeres Bindungsvermögen auf als die untransfizierten CHO-K1-Zellen ( $p = 0,007$ ). Dies bestätigt die Beobachtung, dass das NB1-Protein an ein Molekül der Endothelzellen bindet.



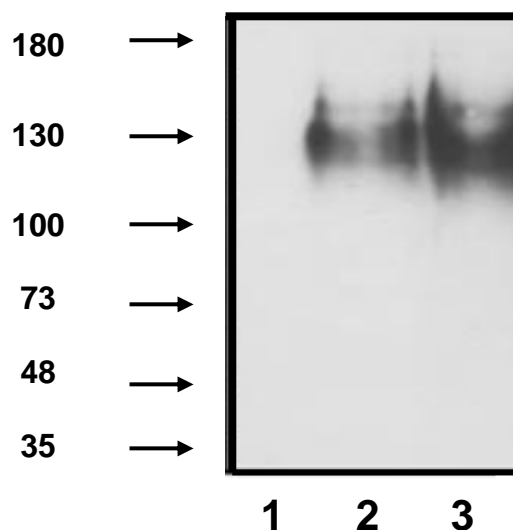
**Abb. 23:** Messung des Anteils gebundener Zellen (%) von CHO-NB1-Zellen bzw. untransfizierten Zellen (CHO-K1) an Endothelzellen. Die Ermittlung erfolgte durch Markierung mit BCECF und anschließender Messung der Fluoreszenzintensität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die dargestellten Ergebnisse der Bindungsstudien zwischen NB1-Molekülen und Endothelzellen gezeigt wurde, dass ein endothelialer Bindungspartner von NB1 existiert. Für eine exaktere Charakterisierung des Liganden sind jedoch weitere, spezifischere Untersuchungen notwendig.



### 3.8.2.4 Immunpräzitationsstudien mit Endothelzellen zur Detektion eines möglichen Partnermoleküls für NB1

Für die weitere Charakterisierung des endothelialen NB1-Liganden erfolgten nun Immunpräzitationsstudien. Dabei wurden kultivierte Endothelzellen biotinmarkiert, lysiert und zu drei Ansätzen aufgeteilt. Für die Ansätze 1 und 2 wurden zunächst Protein-G-beads mit dem Anti-NB1-Ak inkubiert. Ansatz 3 stellt eine Positivkontrolle dar, bei der, für die Darstellung homophiler Bindungen von CD31, Protein-G-beads mit hPECAM-Fc inkubiert wurden. Anschließend erfolgte bei Ansatz 1 eine Inkubation mit BSA (Negativkontrolle), bei Ansatz 2 eine Inkubation mit dem NB1-Protein und bei Ansatz 3 keine weitere Inkubation. Nach der Präzitation der Endothelzellen mit den jeweiligen Ansätzen erfolgte eine Auftrennung unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 24). Während die Inkubation der Endothelzellen mit NB1 ein Präzipitat mit einer Größe von ca. 130 kDa hervorbrachte, ließ sich durch die Inkubation der Endothelzellen mit BSA (3 %) kein Präzipitat feststellen. Die Inkubation der Endothelzellen zusammen mit hPECAM-Fc zeigte die zu erwartende Bande auf einer Höhe von etwa 130 kDa.



**Abb. 24:** Immunpräzitation lysierter Endothelzellen mit NB1. Spur 1: Endothelzellen + BSA (3%) + 7D8 (Negativkontrolle). Spur 2: Endothelzellen + NB1 + 7D8. Spur 3: Endothelzellen + hPECAM-Fc (Positivkontrolle)

Aufgrund der früheren Beobachtungen, dass NB1 bei der Interaktion zwischen Granulozyten und Endothelzellen eine Rolle spielt (Stroncek et al., 1994), der oben gezeigten Darstellung der Existenz eines endothelialen Bindungspartners von NB1 und der durch die Immunpräzipitation ermittelten Größe von ca. 130 kDa, konnte nun eine Literaturrecherche nach potentiellen Bindungspartnern erfolgen. Dabei wurden folgende Proteine gefunden, welche aufgrund ihres Molekulargewichts und ihrer Lokalisation bzw. Funktion in Frage kommen:

- 1.) E-Selektin (CD62E), mit einem Molekulargewicht von 130 kDa, welches auf der Endothelzelloberfläche exprimiert wird und beim Leukozytenrollen von Bedeutung ist (Varki, 1994).
- 2.) PECAM-1 (CD31), ein Protein welches bei der Transmigration der Neutrophilen durch das Endothel eine Rolle spielt und ebenfalls ein Molekulargewicht von 130 kDa besitzt (Ilan & Madri, 2003).

### **3.8.2.5 Interaktionsstudien mit spezifischen Partnern**

#### **A) Interaktion zwischen NB1 und E-Selektin (CD62E)**

Um zu überprüfen, an welches Molekül der Endothelzellen das NB1-Protein bindet, wurde zunächst E-Selektin (jeweils 1 µg) in die Vertiefungen einer Flachbodenplatte gegeben und für vier Std. inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von CHO-K1- bzw. CHO-NB1-Zellen mit nachfolgender Inkubation. Nach Zugabe von Fixierungs- und Messlösung erfolgte wiederum die Messung der Extinktion am Plattenphotometer. Der Medianwert der Extinktion der untransfizierten Zellen lag mit OD = 0,46 auf dem gleichen Niveau wie der Wert der CHO-NB1-Zellen mit OD = 0,49. Eine Veränderung war auch nicht zu beobachten, wenn die Menge an E-Selektin, die Menge an CHO-Zellen oder auch die Inkubationsbedingungen verändert wurden. Eine Bindung des NB1-Proteins an E-Selektin konnte somit nicht gezeigt werden.

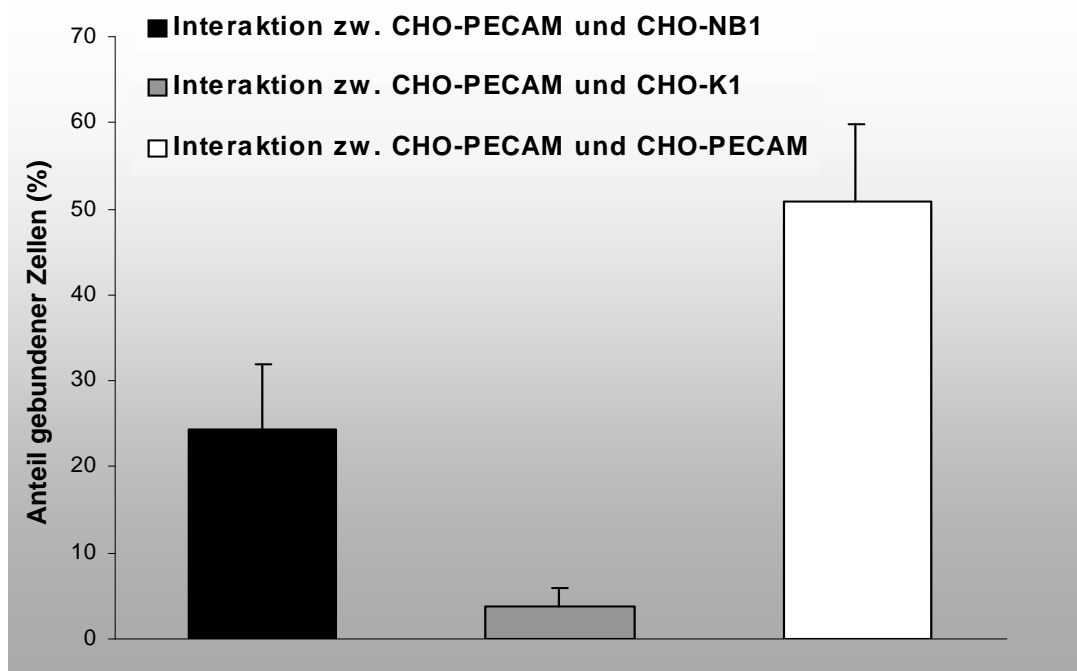
Um zu überprüfen, ob NB1 am Durchflusszytometer mit E-Selektin ebenfalls keine Bindung eingeht wie in den Zelladhäsionstests mit Kristall-Violett-Anfärbung, wurden transfizierte CHO-NB1-Zellen mit E-Selektin-Molekülen 1 Std. bei RT oder auch bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation mit einem FITC-markierten Anti-E-Selektin-Antikörper erfolgte die Überprüfung der Bindungsaktivität von E-Selektin an den CHO-NB1-Zellen am Durchflusszytometer. Wie in den zuvor dargestellten Zell-

Adhäsionstests zeigte sich auch hier keine Bindung zwischen NB1 und E-Selektin. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei dem endothelialen NB1-Liganden nicht um CD62E handelt.

### **B) Interaktion zwischen NB1 und PECAM-1 (CD31)**

Auf gleiche Art und Weise wie in Kap. 3.8.2.3 beschrieben, wurden weitere Adhäsionstests mit Fluoreszenzmarkierung durchgeführt, nur das statt der Endothelzellen mit PECAM-1 transfizierte CHO-Zellen eingesetzt wurden. Zusätzlich wurden zur Kontrolle auf CHO-PECAM-Zellen BCECF-markierte CHO-PECAM-Zellen gegeben.

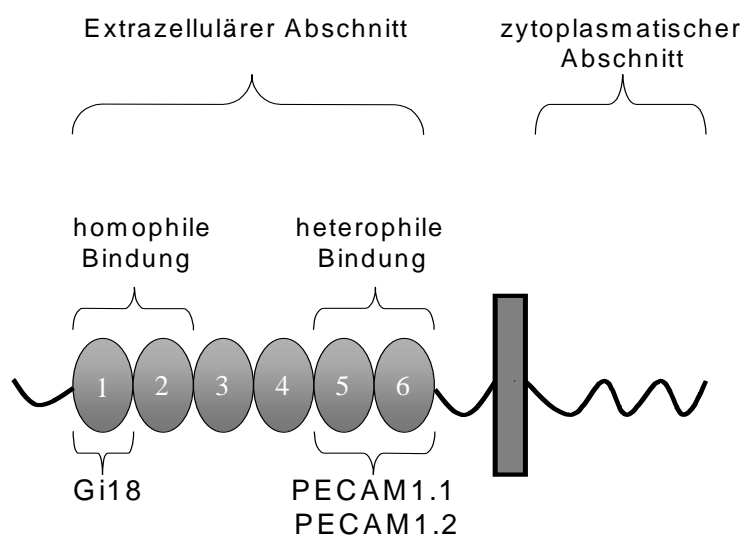
Während die untransfizierten Zellen keine Bindung mit CHO-PECAM-1 eingehen, zeigt sich eine deutliche Bindungsaktivität von NB1 zu PECAM-1 (Abb. 25). Der Unterschied zwischen CHO-NB1-Zellen und den CHO-K1-Zellen ist mit  $p = 0,014$  statistisch signifikant. PECAM-1 kann homophile Bindungen eingehen (Albelda et al., 1991), daher wurde hier die homophile Interaktion zwischen PECAM-1 und PECAM-1 als Positivkontrolle benutzt. Keinen Einfluß auf das Testergebnis hat die Wahl der zu markierenden Zellgruppe. Ob die CHO-PECAM-Zellen fluoreszenzmarkiert werden oder die CHO-NB1- bzw. die CHO-K1-Zellen, zeigt keinen Unterschied am Anteil an gebundenen Zellen auf.



**Abb. 25:** Messung des Anteils gebundener Zellen (%) von CHO-NB1-Zellen, untransfizierten Zellen (CHO-K1) bzw. CHO-PECAM-Zellen an PECAM-1. Die Ermittlung erfolgte durch Markierung mit BCECF und anschließender Messung der Fluoreszenzintensität.

Da aufgrund der Adhäsionstests PECAM-1 als potentieller Kandidat für den endothelialen NB1-Rezeptor hervorgetreten ist, soll dieses Ergebnis durch weitere, durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigt werden. Dabei wurden spezifische Anti-PECAM-Antikörper eingesetzt, welche, durch die vorherige Inkubation mit den Endothelzellen, die mögliche Bindung von NB1 an PECAM-1 auf den Endothelzellen blockieren sollen.

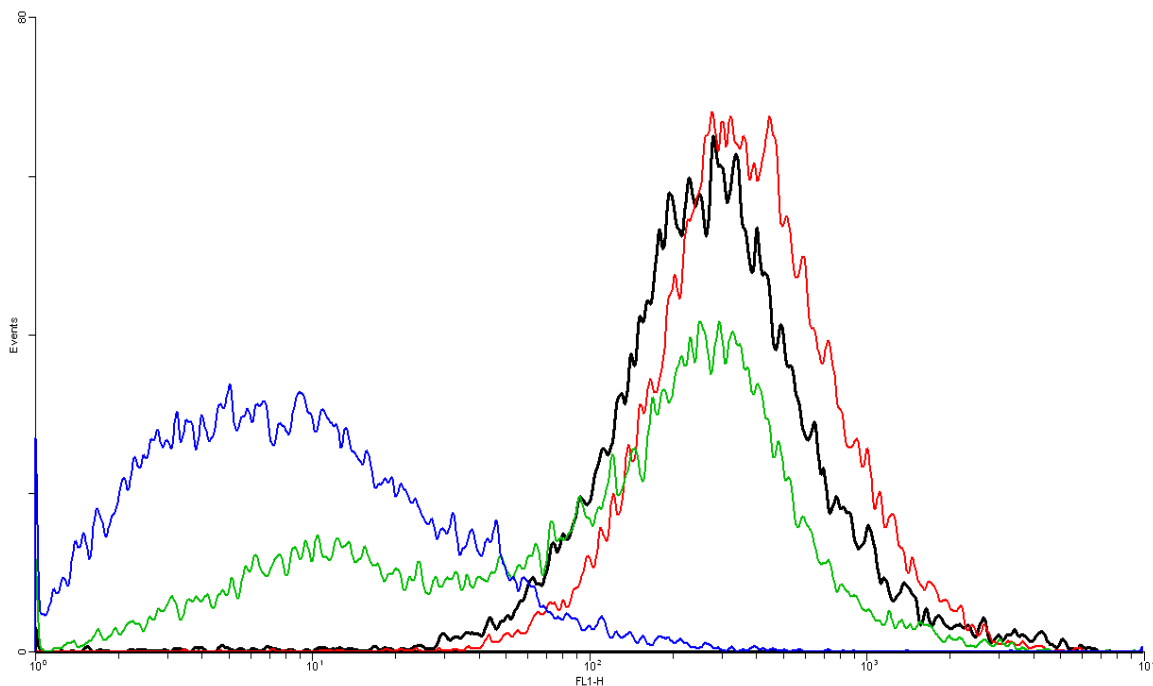
PECAM-1 ist ein transmembranes Protein mit einer komplexen zytoplasmatischen Domäne, einem transmembranen Abschnitt sowie einem aus sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen bestehenden extrazellulären Abschnitt (Abb. 26) (Newman, 1997; Jackson, 2003). Dabei sind die verschiedenen extrazellulären Domänen für unterschiedliche Bindungen verantwortlich. Während heterophile Bindungen durch die Domänen 5 und 6 vermittelt werden (Liao et al., 1995; Yan et al., 1995), sind die Domänen 1 und 2 für die homophilen Bindungen verantwortlich (Muller et al., 1993; Bogen et al., 1994; Liao et al., 1995; Liao et al., 1997).



**Abb. 26:** Schematische Darstellung von PECAM-1 (CD31). PECAM-1 ist ein 130 kDa großes Molekül mit einem extrazellulären Abschnitt bestehend aus sechs Ig-ähnlichen Domänen, einem transmembranen Teil und einem zytoplasmatischen Abschnitt.

Die bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen eingesetzten Antikörper gegen PECAM-1 erkennen verschiedene Epitope auf unterschiedlichen Domänen: Gi18 bindet an Domäne eins des extrazellulären Abschnitts, die Antikörper PECAM1.1 und PECAM 1.2 sind jedoch spezifisch für die extrazellulären Domänen fünf und sechs.

Zur Durchführung der Blockierungsstudien wurden zunächst Endothelzellen mit dem jeweiligen Anti-PECAM-Antikörper inkubiert, erst danach kam es zur Zugabe des NB1-Proteins. Im letzten Inkubationsschritt wurde der Komplex mit dem biotinmarkierten Anti-NB1-Ak 7D8 komplettiert (Abb. 27).



**Abb. 27:** Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des NB1-Moleküls an Endothelzellen nach vorheriger Inkubation des Endothels mit verschiedenen Anti-PECAM-Antikörpern.

**Schwarze Kurve:** Endothelzellen + NB1

**Rote Kurve:** Endothelzellen + Gi18 + NB1

**Grüne Kurve:** Endothelzellen + PECAM 1.1 + NB1

**Blaue Kurve:** Endothelzellen + PECAM 1.2 + NB1

Werden die Endothelzellen zunächst mit dem Anti-PECAM-Ak Gi18 inkubiert, können die NB1-Proteine in gleichem Maße an das Endothel binden wie bei einer Inkubation ohne einen blockierenden Anti-PECAM-Ak. Beide Kurven zeigen eine ähnliche Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI = 287 bzw. MFI = 324) . Erfolgt anstelle von Gi18 eine Inkubation mit dem Antikörper PECAM 1.1 , so zeigt sich eine Abschwächung des Signals (MFI = 133). Wird das Endothel zunächst mit dem Antikörper PECAM 1.2 inkubiert, sind die endothelialen PECAM-Moleküle auf eine Art und Weise blockiert, in der das NB1-Protein nicht mehr in der Lage ist, an den Endothelzellen bzw. an PECAM-1 zu binden (MFI = 23).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die aufgeführten Untersuchungen aufgezeigt wurde, dass PECAM-1 den endothelialen Liganden für NB1 darstellt. In den Adhäsionsversuchen zeigt sich eine Bindungsaktivität zwischen CHO-NB1- und CHO-PECAM-Zellen, während zwischen CHO-K1- und CHO-PECAM-Zellen keine Bindung nachgewiesen werden konnte. Auch in den durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte eine Bindung zwischen NB1 und dem Endothel gezeigt werden. Werden die Endothelzellen jedoch zunächst mit einem Anti-PECAM-Antikörper inkubiert, welcher die extrazellulären Domänen fünf und sechs blockiert, ist die Bindung zwischen NB1 und dem Endothel aufgehoben. Bei der Anwesenheit eines Antikörpers gegen die Domäne eins des PECAM-Moleküls ist jedoch weiterhin eine Bindung von NB1 möglich.

## 4 Diskussion

Das granulozytäre Antigen NB1 wurde erstmals 1971 beschrieben (Lalezari et al., 1971). Hierbei zeigte sich seine Bedeutung in der Entstehung neonataler Autoimmun-Neutropenien. Die eigentliche funktionelle Bedeutung von NB1 ist allerdings bis heute ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass NB1 nicht nur in einer zellgebundenen, sondern auch in einer löslichen Form vorliegt. Die Menge an löslichen NB1 im Plasma unterliegt dabei äußeren Einflüssen. Die zellständige Form ist nach Antikörperbindung in der Lage, eine Signaltransduktion in den Granulozyten zu bewirken und dadurch die funktionellen Eigenschaften neutrophiler Granulozyten zu beeinflussen. Durch weiterführende Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass NB1 auf Granulozyten mit endothelialen PECAM-1 Molekülen eine spezifische Wechselwirkung eingehen kann. Seine funktionelle Bedeutung besitzt NB1 im Rahmen der Transmigration von Granulozyten durch das Gefäßendothel, entweder als ein Protein mit reiner Ankerfunktion oder als Signalmolekül zwischen den Granulozyten und Endothelzellen. PECAM-1 ist somit der erste nachgewiesene Bindungspartner des granulozytären Antigens NB1 (CD177).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu Beginn ein ELISA-Testverfahren entwickelt, mit dem eine schnelle und exakte Bestimmung des mittleren NB1-Gesamtgehalts, d.h. sowohl intrazellulären als auch auf der Zelloberfläche vorhandenen Proteins, neutrophiler Granulozyten möglich ist. Bisherige Methoden erlaubten nur eine Aussage über die Oberflächenkonzentration und die Größe der NB1-positiven Subpopulation. Es wurde gezeigt, dass durch den etablierten ELISA eine exakte Bestimmung des mittleren NB1-Gesamtgehalts möglich ist. Bei sämtlichen 94 Testpersonen lag der ermittelte Absorptionswert im linearen Messbereich der Standardkurve. Der NB1-Gesamtgehalt zeigt keine signifikante alters- bzw. geschlechtsbedingte Variation, besitzt allerdings eine hohe interindividuelle Varianz (Mittelwert  $89,3 \pm 30,6$  ng/ml).

Durch den etablierten ELISA konnte gezeigt werden, dass NB1 im Plasma als lösliche Form vorhanden ist. Die ermittelten Konzentrationen lagen dabei im Bereich zwischen 9 – 37 ng/ml Plasma und zeigten keine signifikante Korrelation zu den zellständigen NB1-Konzentrationen. Dass es sich hierbei nicht nur um Proteine handelt, welche durch Proteolyse freigesetzt wurden, bzw. um Artefakte untergegangener Granulozyten, wurde durch mehrere Methoden untersucht und bestätigt. Dabei zeigte sich, dass es sich bei dem im Plasma vorkommenden NB1 um eine echte lösliche Form (sNB1) handelt, welche aktiv von ihrer GPI-Verankerung freigesetzt wird. Obwohl der GPI-Anker das jeweilige Molekulargewicht nicht beeinflusst (Wilhelm et al., 1999) und dieses somit keinen Hinweis auf das Vorhandensein bzw. Fehlen des GPI-Moleküls gibt, konnte durch die Phasen-Separation mit Triton X-114 gezeigt werden, dass die im Plasma vorhandenen NB1-Moleküle keinen GPI-Anker aufweisen. Eine Abspaltung von NB1 von der granulozytären Oberfläche durch eine GPI-spezifische Phospholipase C (GPI-PLC) wurde bereits in einer früheren Arbeit gezeigt (Kissel, 2002). Somit ist NB1 ein weiteres GPI-verankertes Molekül, welches zusätzlich als lösliche Form im Plasma existiert (Fleit et al., 1992; Mizukami et al., 1995). Die Konzentrationen an löslichem NB1 im Plasma weisen ebenso wie die Zelloberflächenkonzentrationen große individuelle Unterschiede auf. Das Geschlecht und das Alter haben dabei keinen Einfluß auf die Menge. Der Plasmagehalt zeigt keine signifikante Korrelation mit der NB1-Konzentration auf der Zelloberfläche. Ein weiterer Faktor, welcher die Konzentration an löslichen Molekülen beeinflussen kann, ist deren Halbwertszeit, welche für sNB1 allerdings unbekannt ist.

Vergleicht man die funktionellen Eigenschaften der löslichen Formen GPI-verankerter Proteine, so konnte bei einigen dieser Proteine eine erhöhte Plasma-Konzentration im Rahmen verschiedener Erkrankungen aufgezeigt werden, so z.B. für CD14 bei Patienten mit schwerem Trauma (Kruger et al., 1991) oder für FcγRIIIb bei Personen mit ARDS bzw. rheumatoider Arthritis (Fleit et al., 1992; Fridman et al., 1993). Auch für die lösliche Form von uPAR, dem Protein mit der strukturell größten Ähnlichkeit zu NB1, wurden erhöhte Plasmakonzentrationen bei verschiedenen Krebserkrankungen sowie bei Entzündungen aufgezeigt (Wilhelm et al., 1999). Ob die Konzentration von sNB1 ebenfalls im Rahmen entzündlicher Erkrankungen ansteigt, ist bisher noch nicht bekannt. Hinweise dafür ergeben sich jedoch durch das Ergebnis, dass es unter Einfluss von G-CSF zu einer Zunahme der



Konzentration von sNB1 kommt (s. Kap. 3.7.1 und 3.7.2). Weitere Untersuchungen, bei denen eine Zunahme der NB1-mRNA sowie der zellulären Oberflächenkonzentration bei schweren bakteriellen Infektionen beobachtet wurde, deuten ebenfalls auf diesen Umstand hin (Göhring et al., 2004). Die Freisetzung von uPAR in das Plasma wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst bzw. reguliert. So wurde gezeigt, dass Ovar-Tumorzellen eine GPI-spezifische Phospholipase D sezernieren, welche für eine Erhöhung der Konzentration an suPAR verantwortlich ist (Wilhelm et al., 1999). Die Konzentration an suPAR korreliert dabei nicht mit der jeweiligen Zellexpression und die Freisetzung durch GPI-PLD ist ein durch Zytokine regulierbarer Prozess (Sitrin et al., 1994; Mizukami et al., 1995). Eine vermehrte Freisetzung von uPAR von Endothelzellen durch die Faktoren IL-1 $\beta$ , basic fibroblast growth factor und vascular endothelial growth factor wurde ebenfalls gezeigt (Chavakis et al., 2001). Diese Ergebnisse lassen auch die Existenz von Faktoren annehmen, welche die Freisetzung von sNB1 regulieren. Unklar ist bisher allerdings der Ursprung von sNB1. Hier kommen neben den zirkulierenden Granulozyten auch die Neutrophilen aus dem Knochenmark in Frage. Untersuchungen zeigten eine erhöhte Menge an NB1-mRNA in neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark im Vergleich zu peripheren Zellen (Passamonti et al., 2004). Neutrophile Granulozyten könnten z.B. im Rahmen ihrer Reifung NB1 in Form löslicher Moleküle freisetzen. Für eine Herkunft aus dem Knochenmark spricht ebenfalls die Beobachtung, dass bei einer Aktivierung der peripheren Granulozyten der zelluläre NB1-Gesamtgehalt unverändert bleibt. Dies würde sich dadurch erklären lassen, dass entweder sNB1 nicht von diesen Zellen stammt sondern aus dem Knochenmark oder dass eine Neubildung im Zeitraum zwischen den einzelnen Messungen vor bzw. nach einer Aktivierung stattgefunden hat. Weiterhin übt G-CSF einen größeren Einfluss auf das Knochenmark als auf periphere Zellen aus. Für einen Ursprung aus den peripheren neutrophilen Granulozyten spricht das Ergebnis, dass es nach einer Stimulation durch fMLP zu einem Anstieg der zellulären Oberflächenexpression bzw. durch G-CSF zu einem Anstieg der Konzentration an sNB1 kommt. Dass NB1 aktiv von der Zelloberfläche abgespalten werden kann wurde bereits in früheren Untersuchungen gezeigt (Kissel, 2002).

Einige lösliche Formen GPI-verankerter Proteine dienen als Tumor-Marker (Wilhelm et al., 1999). Da NB1 bei bakteriellen Infektionen sowohl auf mRNA-Ebene als auch

in der Zellexpression ansteigt, wäre eine vermehrte Freisetzung von sNB1 z.B. bei Patienten mit Sepsis durchaus denkbar.

Die lösliche Form von NB1 kann ebenfalls einen Einfluss auf die Funktion der zellständigen Form haben. So könnte sNB1 durch die Bindung an den Liganden des zellmembranständigen NB1 eine kompetitive Hemmung verursachen, die der eigentlichen Funktion des zellulären Proteins entgegenwirkt. Gleichzeitig könnte auch eine vermehrte Freisetzung von zellulärem NB1 ins Plasma eine Verminderung der Zellkonzentration an NB1 bedeuten, so dass auf diese Weise eine Hemmung der Ligandenbindung durch ein vermindertes Vorhandensein von membranständigen Molekülen zustande kommt. Das Vorhandensein einer löslichen Form kann jedoch auch einen unterstützenden Effekt auf die Funktion des zellmembranständigen Proteins haben. So könnte z.B. vor der Transmigration neutrophiler Granulozyten durch das Gefäßendothel eine vermehrte Freisetzung und somit eine Konzentrationserhöhung von sNB1 erfolgen, welche nun an den endothelialen Liganden von NB1 binden (s.u.) und dadurch das Endothel in einen für die Transmigration notwendigen aktivierten Zustand versetzen. Dadurch würde NB1 auch indirekt Einfluss nehmen auf die Funktion NB1-negativer Granulozyten oder auf das Endothel selbst.

Die gleichzeitige Bestimmung des Gesamtgehalts durch den ELISA und des Oberflächengehalts durch die Durchflusszytometrie erlaubt eine Aussage über die Verteilung des Antigens über die gesamte Zelle, was zum besseren Verständnis der bisher nur ungenügend bekannten Regulation von NB1 beiträgt.

Die mittlere Konzentration an NB1 auf der Zelloberfläche betrug  $34,2 \pm 15,5 \times 10^3$  NB1-Moleküle pro NB1-positiver Zelle. Verschiedene Ursachen für die Entstehung von unterschiedlichen NB1- Oberflächenkonzentrationen sind möglich. Der Vergleich des NB1-Gesamtgehalts und der NB1-Oberflächenkonzentration macht jedoch deutlich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern existiert. Je höher der Gesamtgehalt ist, desto höher ist die mittlere Oberflächenkonzentration.

Bei den Untersuchungen zur NB1-Expression kam es, im Gegensatz zu einigen anderen Arbeiten (Taniguchi et al., 2002; Caruccio et al., 2003), zu keinem eindeutigen Unterschied in der NB1-Expression zwischen Frauen und Männern (Medianwert 48 % zu 54 %). Auffällig war jedoch die signifikant geringere Expression

von NB1 bei der Gruppe der Frauen über 45 Jahre (33 %). Dieses Ergebnis bestärkt die Theorie, dass Sexualhormone auf die Größe der NB1-positiven Subpopulation einwirken können (Stroncek et al., 1998a; Matsuo et al., 2000; Caruccio et al., 2003; Taniguchi et al., 2004). Dass beispielsweise Östrogenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten existieren und Östrogene einen Einfluss auf die Zellfunktion besitzen, wurde bereits vielfach gezeigt (Ito et al., 1995; Nathan et al., 1999; Stefano & Peter, 2001; Abrahams et al., 2003; Molloy et al., 2003).

Ein bislang nicht ausreichend untersuchter Aspekt ist die Frage, ob die jeweils gemessene NB1-Expression konstant ist oder lediglich einen augenblicklichen Wert darstellt. Nur Goldschmeding et al. (1992) untersuchten die NB1-Expression von 16 Personen dreimal im Abstand von jeweils zwei Monaten. Es zeigte sich, dass es in etwa 50 % der Fälle zu signifikanten Unterschieden gekommen ist. Dies korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wo es bei einigen Personen im Rahmen zahlreicher Wiederholungen zu einer erheblichen Fluktuation der NB1-positiven Subpopulation gekommen ist. Dadurch wird deutlich, dass eine einmalige Messung der NB1-Expression nicht ohne weiteres einen Rückschluss auf den ständig vorhandenen Gehalt an NB1 erlaubt.

Da neutrophile Granulozyten vor ihrer eigentlichen Funktion im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr durch verschiedene Substanzen in einen aktivierten Zustand versetzt werden, ist es für die funktionelle Charakterisierung von NB1 von großer Bedeutung, wie sich NB1 bei einer Stimulation der Neutrophilen verhält.

Werden daher neutrophile Granulozyten mit bioaktiven Substanzen wie fMLP stimuliert, zeigt sich nach 30 min ein Anstieg der Oberflächenkonzentration von NB1 im Mittel um etwa 33 %. Erfolgt die Stimulation der Zellen allerdings für 24 Std., so entspricht die Oberflächenkonzentration an NB1 dem Ausgangswert für unstimulierte Zellen. Demnach kommt es durch die Aktivierung der Granulozyten zunächst zu einer relativ schnellen Zunahme an NB1 auf der Zelloberfläche, gefolgt von einem Abfall auf die Ursprungswerte innerhalb von 24 Std. Ein Rückgang auf den Ursprungswert kann durch eine Internalisierung der nun vermehrten Oberflächenproteine stattfinden oder durch eine Freisetzung von NB1 in das Plasma. Für eine Freisetzung spricht auch das Ergebnis, dass lösliches NB1 nach Zellaktivierung vermehrt vorkommt. Daraus folgt dass NB1 in dem Zeitraum eine Rolle spielen muss, in dem sich die Zellen in einem aktivierten Zustand befinden.

Dazu gehören z.B. die Phase der Transmigration der Zellen aus den Gefäßen oder auch der „respiratory burst“ mit der Zerstörung des jeweiligen Fremdkörpers.

Bisherige Untersuchungen zur Auswirkung einer Stimulation neutrophiler Granulozyten auf deren NB1-Expression waren fast ausschließlich von gleichem Ergebnis. Durch eine Stimulation erfolgt eine Zunahme der Oberflächenkonzentration, während die NB1-Expression, also der Anteil an NB1-positiven Zellen, stets gleich bleibt (Skubitz et al., 1991; Goldschmeding et al., 1992; Göhring et al., 2004). Dabei wurde jedoch nicht der Zeitraum berücksichtigt, wie lange die Zellen der jeweiligen Stimulans ausgesetzt waren. Lediglich eine Untersuchung kontrollierte den Verlauf der NB1-Expression über mehrere Tage während der Gabe von G-CSF (Stroncek, 1998b). Dabei zeigte sich nun, im Gegensatz zu den übrigen Untersuchungen, eine Erhöhung des Anteils an NB1-positiven Zellen. Dieses Ergebnis konnte durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Ermittelt man die Größe der NB1-positiven Subpopulation nach einer 30-minütigen Stimulation, so ist kein Anstieg festzustellen. Werden die Zellen jedoch für 24 Std. inkubiert, so erfolgt ein Anstieg von im Mittel  $49,4 \pm 20,9 \%$  auf  $60,1 \pm 20,2 \%$  NB1-positiver Granulozyten. Dieser Anstieg ist unabhängig davon, ob die Zellen mit fMLP, G-CSF oder ohne Stimulans inkubiert wurden. Es ist wahrscheinlich, dass die Zellen bereits durch das Experiment selbst aktiviert wurden, so dass die Zugabe von fMLP oder G-CSF nicht als notwendig erscheint. Diese Daten bestätigen unter anderem das Ergebnis zur Überprüfung der NB1-Expression über mehrere Monate (s. Kap. 3.5.2). Auch hier wurde deutlich, dass die Größe der NB1-positiven Subpopulation nicht konstant ist, was bislang stets angenommen wurde, sondern von mehreren Faktoren abzuhängen scheint.

Um auszuschließen, dass diese Stimulationsergebnisse nicht durch andere Einflüsse verfälscht werden (beispielsweise könnten NB1-positive Zellen länger überleben als NB1-negative, was eine Veränderung des Mengen-Verhältnisses NB1-positive Zellen/NB1-negative Zellen bedeuten würde), wurde die NB1-negative Subpopulation gesondert untersucht. Durch eine Separation dieser Zellen durch einen Zellsorter konnten nun die negativen Zellen isoliert von den positiven Granulozyten stimuliert und inkubiert werden. Dabei wurden die vorherigen Ergebnisse bestätigt. In der Gruppe der NB1-negativen Zellen waren nach 24 Std. nun 20 % der Zellen NB1-positiv. Es erscheint als sehr wahrscheinlich, dass diese Zellen aktiviert bzw. stimuliert werden, z.B. durch das experimentelle Vorgehen selbst (Neutrophile

werden bereits durch die Isolierung aus dem Vollblut stimuliert) oder auch durch den direkten Kontakt mit zahlreichen apoptotischen Zellen, die durch das experimentelle Vorgehen entstehen.

Da im Rahmen dieser Arbeit bereits die Existenz einer löslichen Form von NB1 nachgewiesen wurde, sollte auch die Frage beantwortet werden, ob es durch eine Stimulation der neutrophilen Granulozyten zu einer Zunahme der Konzentration an sNB1 kommt. Dazu wurde das Plasma von Personen untersucht, welche im Rahmen einer Granulozytenspende mit G-CSF stimuliert wurden. Dabei kam es zu einer deutlichen Zunahme der Konzentration an NB1 im Plasma. Die Konzentration stieg im Mittel um  $4,99 \pm 3,28$  ng/ml Plasma. Dieser Anstieg war unabhängig vom Anstieg der Zahl an zirkulierenden neutrophilen Granulozyten. Ermittelt man zu den gleichen Zeitpunkten den zellulären Gesamtgehalt an NB1, so bleibt dieser hingegen auf annähernd gleichen Werten. Fasst man diese in vivo Untersuchungen zusammen, so stellt sich die Frage, woher die nach der Stimulation vermehrt vorhandenen sNB1-Moleküle stammen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit stammen einige Moleküle von der Zelloberfläche durch Abspaltung von ihrer GPI-Verankerung. Da jedoch der zelluläre NB1-Gesamtgehalt vor und nach der Stimulation sich auf einem gleichen Level befindet, müsste die durch die Stimulation bedingte Mengenzunahme und vermehrte Abgabe ins Plasma bereits vor der jeweiligen Zweitmessung abgeschlossen sein. Der Zeitabstand zwischen den Messungen betrug etwa 24 Std. Weiterhin könnten die sNB1-Proteine nicht von peripheren Granulozyten stammen, sondern aus dem Knochenmark. Dies würde erklären, warum kein Anstieg des NB1-Gesamtgehalts in den Neutrophilen zu beobachten ist. Eine Erhöhung der zellulären Oberflächenkonzentration durch eine Stimulation käme dann durch eine Verlagerung der Proteine aus intrazellulären Bereichen an die Oberfläche zustande. Dass GCSF einen höheren Einfluss auf das Knochenmark als auf periphere Zellen besitzt, wurde in anderen Untersuchungen dargestellt (Kerst et al., 1993).

Um die Frage zu adressieren, ob NB1 als zellständiges Molekül dazu in der Lage ist, Signale in den Granulozyten zu übertragen, wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten in Anwesenheit von Anti-NB1-Antikörpern gemessen. Dass die Bindung von Antikörpern einen funktionellen Einfluss auf die jeweilige Zielzelle haben kann, wurde bereits mehrfach untersucht und gezeigt (Nardi et al., 2001). Ebenso scheint die Bindung von Anti-NB1-

Antikörpern die Abwehrfunktion neutrophiler Granulozyten zu beeinflussen, wenn auch die bislang vorliegenden Arbeiten gegensätzliche Ergebnisse hervorbrachten (s. Kap. 1.3.4).

Werden neutrophile Granulozyten mit Anti-NB1-Antikörpern inkubiert, zeigt sich eine deutliche Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Dass es sich hierbei um einen spezifischen Effekt handelt, zeigen die Kontrollversuche mit DPI, einem Inhibitor der NADP(H)-Oxidase. In Anwesenheit von DPI wird die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass zellmembranständige NB1-Moleküle, trotz des Fehlens transmembraner Abschnitte, zur Signaltransduktion fähig sind und einen direkten Einfluss auf die Funktion neutrophiler Granulozyten haben. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird potenziert durch eine Aktivierung der Zellen mit bioaktiven Substanzen (z.B. durch fMLP). Dieses lässt sich mit der zuvor dargestellten, durch fMLP verursachten Konzentrationserhöhung an membranständigen NB1 erklären. Dass dabei auch der Anteil an NB1-positiven Zellen einen direkten Einfluss auf die Sauerstoffradikalbildung hat, zeigt sich dadurch, dass bei Personen mit einem hohen Anteil an NB1-positiven Zellen eine vorherige Stimulation mit fMLP nicht notwendig ist, um durch Antikörperbindung die Sauerstoffradikalbildung auszulösen. Bei Personen mit einem geringen Anteil an NB1-positiven Zellen kommt es dagegen erst nach der Stimulation mit fMLP zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Diese Ergebnisse decken sich mit den zuvor gemachten Beobachtungen und bekräftigen die Vermutung, dass NB1 eine Rolle im Immungeschehen spielt.

Untersuchungen ex vivo haben ergänzend gezeigt, dass NB1 eine Rolle spielt in der Entstehung des Transfusions-assoziierten akuten Lungenödems (TRALI), und dabei durch die Induktion der Sauerstoffradikalbildung zu einer Schädigung des Gefäßendothels führt (Sachs et al., 2006).

Bei den Untersuchungen zu den funktionellen Eigenschaften des NB1-Proteins wurden zunächst Überlegungen angestellt, in welchem Abschnitt der granulozytären Funktion NB1 von Bedeutung sein könnte. Wie bereits zuvor erwähnt ist es durchaus möglich, dass ein gewisser Anteil an sNB1 nicht von der Oberfläche zirkulierender Granulozyten, sondern direkt aus dem Knochenmark stammt. So könnte NB1 während der Zellreifung abgelöst werden und evtl. auch einen Reifungsmarker darstellen. Da jedoch frühere Untersuchungen aufgezeigt haben, dass die

Proteinexpression während der Zelldifferenzierung unverändert bleibt und periphere Granulozyten die gleiche Expression aufweisen wie ihre Vorläuferzellen, wurde diese Möglichkeit zunächst als eher unwahrscheinlich bewertet (Clement et al., 1983; Stroncek et al., 1998a). Dass NB1 die Bildung von Sauerstoffradikalen neutrophiler Granulozyten beeinflusst, wurde bereits oben beschrieben und wird auch durch frühere Arbeiten bestätigt (Bux et al., 1993a). Eine Beeinflussung der Chemotaxis der Zellen konnte bislang nicht bestätigt werden, so dass auch diese Möglichkeit zunächst nicht den Untersuchungsschwerpunkt darstellt (Stroncek et al., 1994). In der gleichen Arbeit wurde jedoch ein Unterschied im Adhäsionsverhalten zwischen NB1-negativen und NB1-positiven Zellen an Endothelzellen festgestellt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit unserer Vermutung, dass NB1 unmittelbar an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt sein kann. Da hierzu jedoch keine nachfolgenden Untersuchungen zu finden sind, die dieses Ergebnis bestätigen oder widerlegen, richtete sich das Augenmerk dieser Arbeit nun auf das mögliche Vorhandensein eines NB1-Counterrezeptors auf diesem Zelltyp. Die Beeinflussung des Endothels durch NB1 wäre nur möglich, wenn sich dort ein potentieller Ligand befindet.

Zunächst wurde allgemein die Bindung NB1-transfizierter Zellen an sowohl unstimulierten als auch stimulierten Endothelzellen überprüft. Die NB1-Transfektanten zeigten durchflusszytometrisch eine starke Bindung an unstimulierten und stimulierten Endothelzellen. Auch im Adhäsionstest zeigte sich eine deutliche Interaktion zwischen NB1 und Endothelzellen. Um den nun tatsächlich vorhandenen Bindungspartner weiter zu charakterisieren, erfolgte durch Immunpräzipitation die Bestimmung seines Molekulargewichts von 130 kDa. Aufgrund von Literaturrecherchen kamen zwei potentielle Kandidaten in Betracht, die zum einen das entsprechende Molekulargewicht aufweisen, zum anderen bei der endothelialen Adhäsion bzw. Transmigration von Granulozyten eine Rolle spielen:

E-Selektin (CD62E) und PECAM-1 (CD31) (Varki, 1994; Ilan & Madri 2003).

Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften fiel der erste Verdacht auf PECAM-1. Während dieses sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Endothelzellen auf der Oberfläche vorhanden ist, ist E-Selektin nur auf stimulierten Endothelzellen zu finden.

Durch die nachfolgenden Untersuchungen wurde dieser Verdacht bestätigt. Während bei Interaktionsstudien mit E-Selektin sowohl in den Adhäsionstests als auch in der

Durchflusszytometrie kein Unterschied in der Bindungsaktivität zwischen NB1-positiven und NB1-negativen Zellen festzustellen war, konnte bei PECAM-1 eine signifikante Differenz festgestellt werden. Die Bindung zwischen NB1 und PECAM-1 konnte durch Anti-PECAM-Ak verhindert werden, deren Epitope auf den Domänen 5 und 6 des PECAM-1-Moleküls zu finden sind. Diese Bereiche sind gleichzeitig für die heterophilen Bindungen von PECAM-1 verantwortlich (Liao et al., 1995). An den Domänen 1 und 2 kommt es zur homophilen Bindung zwischen den PECAM-Molekülen. Erfolgt eine Blockierung mit einem Antikörper, welcher gegen Domäne 1 oder 2 gerichtet ist, kann NB1 weiterhin binden.

Somit wurde bewiesen, dass endotheliales PECAM-1 einen Counterrezeptor für NB1 darstellt; es erfolgt eine heterophile Bindung von NB1 an den letzten beiden Domänen von PECAM-1. PECAM-1 ist damit der erste und bislang einzige Bindungspartner des granulozytären Moleküls NB1. Dieses Ergebnis wurde in der Zwischenzeit durch weitere Untersuchungen verifiziert und bedeutet einen wichtigen Schritt in der funktionellen Charakterisierung von NB1 (Sachs et al., 2007).

Seit langem ist bekannt, dass PECAM-1 von Bedeutung ist bei der Transmigration von Granulozyten durch das Gefäßendothel. Unklar ist bislang der exakte molekulare Mechanismus. PECAM-1 scheint hierbei sowohl als Signalmolekül als auch als Adhäsionsfaktor eine Rolle zu spielen. Homophile Bindungen zwischen PECAM-Proteinen auf den Endothelzellen sind verantwortlich für das Verschieben dieser Moleküle aus den tight-junctions nach Zellkontakt (Sun et al., 2000). Allerdings sind auch homophile Bindungen zwischen leukozytären und endothelialen Proteinen beschrieben worden, welche bei der Transmigration der Zellen eine adhäsive Funktion besitzen sollen (Muller et al., 1993). Durch den Einsatz von Anti-PECAM-Antikörpern kann die Transmigration jedoch nicht vollständig blockiert werden (Bogen et al., 1994).

Weiterhin wird davon ausgegangen, dass die homophilen Bindungen zwischen den PECAM-Molekülen nur schwach ausgeprägt sind, so dass bei dieser Form der Bindung eine adhäsive Funktion aus biophysikalischen Gründen kaum vorstellbar ist (Sachs et al., 2007). Auch andere Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass die homophilen Bindungen keine adhäsive Funktion besitzen, sondern der Signalübermittlung dienen; so z.B. durch eine Hochregulierung von Integrinen (Thompson et al., 2001; Dangerfield et al., 2002) oder der Regulierung von E-Selektin (Litwin et al., 1997).



Dass PECAM-1 ebenso fähig ist heterophile Bindungen einzugehen, wurde in zahlreichen Arbeiten gezeigt. Verschiedene Proteine wurden bereits als Counter-Rezeptoren für PECAM-1 beschrieben, so z.B.  $\alpha\text{v}\beta 3$  oder auch verschiedene Glycoaminoglykane (DeLisser et al., 1993; Buckley et al., 1996). Für die heterophile Bindung zwischen NB1 und PECAM-1 ist sowohl eine adhäsive Funktion als auch die Übermittlung von Signalen denkbar. Erfolgt eine Blockierung sowohl von NB1 als auch von PECAM-1 durch die jeweiligen monoklonalen Antikörper, kommt es zu einer Inhibition der Transmigration. Dies geschieht jedoch nur bei Personen, bei denen mehr als 95 % der Neutrophilen das NB1-Protein exprimieren (Sachs et al., 2007). Hier besteht die Möglichkeit, dass die Funktion der Bindung bei Personen mit einer sehr geringen NB1-Expression durch eine andere Bindung übernommen wird. Besitzt die Bindung NB1  $\Leftrightarrow$  PECAM-1 eine Ankerfunktion, so käme diese im letzten Abschnitt der Transmigration der neutrophilen Granulozyten zustande. Dient NB1 als Signalmolekül, so besteht die Möglichkeit des „outside-in signalling“ oder des „inside-out signalling“. Dass ein „outside-in signalling“ möglich ist, obwohl NB1 keinen zytoplasmatischen Anteil besitzt, wurde zum einen durch die Fähigkeit des GPI-Ankers bewiesen, Signale von außerhalb der Zelle in diese zu übertragen (Kimberly et al., 1990), zum anderen durch unsere Ergebnisse zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies nach Bindung von Anti-NB1-Antikörpern. Bei einem „inside-out signalling“ käme es durch die Bindung zu einer Signalübermittlung über PECAM-1 auf die Endothelzellen. PECAM-1 besitzt in seinem zytoplasmatischen Abschnitt zwei ITIM's, über eine Phosphorylierung kann hier eine Signalvermittlung erfolgen (Newman & Newman, 2003). Aus biophysikalischer Sicht ist die Bindung NB1  $\Leftrightarrow$  PECAM-1 stärker als homophile PECAM-Bindungen. Aus diesem Grund wäre eine adhäsive Funktion dieser Bindung durchaus denkbar.

Damit hat die vorliegende Arbeit neue funktionelle Aspekte in der Charakterisierung des granulozytären Antigens NB1 aufgezeigt. Erstmals wurde mit PECAM-1 ein Bindungspartner von NB1 beschrieben. Dadurch wird eine Beteiligung von NB1 am Prozess der Leukozyten-Transmigration deutlich. Zusätzlich konnte erstmals bewiesen werden, dass NB1 nicht nur als zellständige Form auf neutrophilen Granulozyten, sondern auch als lösliche Form im Plasma existiert. Diese Ergebnisse haben bereits Eingang in zwei Publikationen gefunden (Sachs et al., 2006; Sachs et

al., 2007). Eine weitere Originalarbeit befindet sich in Vorbereitung (Weiss et al., 2008).

## 5 Zusammenfassung

1. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein valides ELISA-Testsystem zu etablieren, mit welchem sowohl der zelluläre Gesamtgehalt an NB1 als auch die Konzentration an löslichem NB1 im Plasma quantitativ zu bestimmen ist. Dabei zeigte sich eine hohe interindividuelle Variabilität der Werte, wie sie gleichfalls bei der Größe der NB1-positiven Subpopulation und der Oberflächenkonzentration an NB1 zu beobachten ist. Geschlechtsspezifische oder altersbedingte Unterschiede im NB1-Gesamtgehalt waren nicht zu ermitteln. Hingegen zeigen Frauen ab einem Alter von 45 Jahren einen signifikanten Abfall der NB1-Expression. Die bislang gültige Annahme dass die NB1-Expression individuell konstant ist, konnte durch wiederholte Messungen, teilweise über einen Zeitraum von über 18 Monaten, widerlegt werden.

2. Erstmals wurde eine lösliche Form von NB1 im Plasma nachgewiesen. Dass es sich dabei um eine echte lösliche Form ohne GPI-Verankerung, und nicht um Artefakte untergegangener Granulozyten handelt, konnte durch verschiedene biochemische Methoden bewiesen werden.

3. Ein weiterer Beweis für die individuelle Variabilität der NB1-Expression wird deutlich, wenn neutrophile Granulozyten für 24 Std. durch bioaktive Substanzen stimuliert werden, was einen Anstieg der NB1-Expression bewirkt. Die Stimulation verursacht ebenso einen Anstieg der Konzentration an sNB1 im Plasma.

4. Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung von NB1 wurde eine Beeinflussung der unspezifischen Immunabwehr durch eine erhöhte Produktion an Sauerstoffradikalen nach Aktivierung des NB1-Rezeptors gezeigt. NB1 ist somit in der Lage, Signale trotz des Fehlens eines zytoplasmatischen Abschnitts zu vermitteln.

5. Erstmals ist es gelungen, einen Bindungspartner von NB1 nachzuweisen. Spezifischer Ligand von NB1 ist das u.a. auf Endothelzellen vorkommende PECAM-1 (CD31). Dadurch wird deutlich, dass NB1 eine funktionelle Bedeutung in der Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch das Gefäßendothel besitzt.

## 6 Summary

1. In this study, we established a sandwich ELISA technique for the detection and quantification of total cellular NB1 and NB1 antigen in plasma. Both total cellular NB1 and NB1 concentration in plasma show high variability among individuals without sex- or age- dependent differences. However, women older than 45 years have significantly lower levels of NB1-expression. We also showed significant fluctuations in the individual percentage of NB1-positive neutrophils.
2. We demonstrated by different biochemical methods that NB1 exists in plasma as a soluble form lacking GPI-anchor.
3. When granulocytes were stimulated with bioactive substances, the percentage of NB1-positive cells increased after 24 hours. The concentration of soluble NB1 in plasma increased also after stimulation.
4. Activation of NB1 can result in the production of reactive oxygen species which requires the ability of “outside-in-signaling” of NB1.
5. We identified a specific interaction between endothelial PECAM-1 and NB1. This is the first description of a binding partner of NB1 and shows that NB1 is involved in the transmigration process of neutrophils through the endothelium.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abrahams VM, Collins J, Wira CR, Fanger MW, Yeaman GR. (2003). "Inhibition of human polymorphonuclear cell oxidative burst by 17-beta-estradiol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Am J Reprod Immunol **50**: 463-472.
- Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. (1991). "Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule." J Cell Biol **114**: 1059-1068.
- Arnaout MA. (1990). "Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18." Blood **75**: 1037-1050.
- Bartunkova J, Araujo A, Hrusak O, Sediva A. (1997). "Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leukocytes." J Clin Immunol **17**: 455-461.
- Bekesi G, Kakucs R., Varbiro S, Racz K, Sprintz D, Feher J, Szekacs B., (2000). "In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes." Steroids **65**: 889-894.
- Bettinotti MP, Olson A, Stroncek D. (2002). "The use of bioinformatics to identify the genomic structure of the gene that encodes neutrophil antigen NB1, CD177." Clin Immunol **102**: 138-144.
- Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. (1989). "Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins." Science **243**: 1160-1165.
- Bierling P, Poulet E, Fromont P, Seror T, Bracq C, Duedari N. (1990). "Neutrophil-specific antigen and gene frequencies in the French population." Transfusion **30**: 848-849.
- Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA. (1994). "Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo." J Exp Med **179**: 1059-1064.
- Boggs DR. (1967). "The kinetics of neutrophilic leukocytes in health and in disease." Semin Hematol **4**: 359-386.
- Bordier C. (1981). "Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution." J Biol Chem **256**: 1604-1607.
- Borregaard N, Cowland JB (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." Blood **89**: 3503-3521.
- Boyum (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by

- combining centrifugation and sedimentation at 1 g." Scand J Clin Lab Invest Suppl **97**: 77-89.
- Bruehl RE, Moore KL, Lorant DE, Borregaard N, Zimmerman GA, McEver RP, Bainton DF. (1997). "Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1." J Leukoc Biol **61**: 489-499.
- Bruehl RE, Springer TA, Bainton DF. (1996). "Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy." J Histochem Cytochem **44**: 835-844.
- Buckley CD, Doyonnas R, Newton JP, Blystone SD, Brown EJ, Watt SM, Simmons DL. (1996). "Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1." J Cell Sci **109**: 437-445.
- Butikofer P, Malherbe T, Boschung M, Roditi I. (2001). "GPI-anchored proteins: now you see 'em, now you don't." FASEB J **15**: 545-548.
- Bux J (2005). "Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion." Vox Sang **89**: 1-10.
- Bux J, Becker F, Seeger W, Kilpatrick D, Chapman J, Waters A. (1996). "Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood." Br J Haematol **93**: 707-713.
- Bux J, Dickmann JO, Stockert U, Mueller-Eckhardt C. (1993a). "Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function." Vox Sang **64**: 220-225.
- Bux J, Jung KD, Kauth T, Mueller-Eckhardt C. (1992b). "Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia." Transfus Med **2**: 143-149.
- Bux J. (2000). "Molecular genetics of granulocyte polymorphisms." Vox Sang **78**: 125-130.
- Bux J. (2002). "Transfusion-Related Acute Lung Injury: A Neglected but Life-Threatening Transfusion Reaction." Infusion Therapy and Transfusion Medicine **29**: 271-276.
- Bux J., Scheffler S, Kissel K., (2000). "Molecular Basis of the NB1 negative phenotype." Blood **96**: 656a.
- Buyon JP, Korchak H, Rutherford LE, Ganguly M, Weissmann G. (1984). "Female hormones reduce neutrophil responsiveness in vitro." Arthritis Rheum **27**: 623-630.
- Caruccio L, Bettinotti M, Director-Myska AE, Arthur DC, Stroncek D. (2006). "The gene overexpressed in polycythemia rubra vera, PRV-1, and the gene encoding a neutrophil alloantigen, NB1, are alleles of a single gene, CD177, in chromosome band 19q13.31." Transfusion **46**: 441-447.

- Caruccio L, Bettinotti M, Matsuo K, Sharon V, Stroncek D. (2003). "Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy." Transfusion **43**: 357-363.
- Caruccio L, Walkovich K, Bettinotti M, Schuller R, Stroncek D. (2004). "CD177 polymorphisms: correlation between high-frequency single nucleotide polymorphisms and neutrophil surface protein expression." Transfusion **44**: 77-82.
- Chakraborty A, Hentzen ER, Seo SM, Smith CW. (2003). "Granulocyte colony-stimulating factor promotes adhesion of neutrophils." Am J Physiol Cell Physiol **284**: 103-110.
- Chatterjee S, Mayor S (2001). "The GPI-anchor and protein sorting." Cell Mol Life Sci **58**: 1969-1987.
- Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, Hersemeyer K, Sachs UJ, Nawroth PP, Preissner KT, Santoso S. (2004). "The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo." J Biol Chem **279**(5355602-5355608).
- Chavakis T, Willuweit AK, Lupu F, Preissner KT, Kanse SM. (2001). "Release of soluble urokinase receptor from vascular cells." Thromb Haemost **86**: 686-693.
- Clay B, (1984). "The frequency of granulocyte-specific antibodies in postpartum sera and a family study of the 6B antigen." Transfusion **24**: 252-255.
- Clement LT, Lehmeyer JE, Gartland GL. (1983). "Identification of neutrophil subpopulations with monoclonal antibodies." Blood **61**: 326-332.
- Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. (1992). "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products." Blood **80**: 2012-2020.
- Cross AR, Jones OTG (1986). "The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils." Biochem J **237**: 111-116.
- Dangerfield J, Larbi KY, Huang MT, Dewar A, Nourshargh S., (2002). "PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane." J Exp Med **196**: 1201-1211.
- Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A. (1996). "Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane." Am J Respir Cell Mol Biol **14**: 288-295.
- DeLisser HM, Yan HC, Newman PJ, Muller WA, Buck CA, Albelda SM. (1993). "Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular

- aggregation involves cell surface glycosaminoglycans." J Biol Chem **268**: 16037-16046.
- Dittmar K, Lim J, Caruccio L, Bettinotti M, Stroncek D (2003). "Assessment of the relative number of copies of the gene encoding human neutrophil antigen-2a(HNA-2a), CD177, and a homologous pseudogene by quantitative real-time PCR." Immunohematology **19**: 122-126.
- Durieux JJ, Vita N, Popescu O, Guette F, Calzada-Wack J, Munker R, Schmidt RE, Lupker J, Ferrara P, Ziegler-Heitbrock HW, et al. (1994). "The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes." Eur J Immunol **24**: 2006-2012.
- Felix JK, Calhoun D (2000). "Neonatal alloimmune neutropenia in premature monozygous twins." Pediatrics **106**: 340-342.
- Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. (1998). "Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP." J Exp Med **187**: 903-915.
- Fischer B, von Knethen A, Brune B. (2002). "Dualism of oxidized lipoproteins in provoking and attenuating the oxidative burst in macrophages: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." J Immunol **168**: 2828-2834.
- Fleit HB, Kobasiuk CD, Daly C, Furie R, Levy PC, Webster RO. (1992). "A soluble form of Fc gamma RIIB is present in human serum and other body fluids and is elevated at sites of inflammation." Blood **79**: 2721-2728.
- Fossati G, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. (2002). "Differential role of neutrophil Fc gamma receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes." Arthritis Rheum **46**: 1351-1361.
- Fridman WH, Teillaud JL, Bouchard C, Teillaud C, Astier A, Tartour E, Galon J, Mathiot C, Sautes C. (1993). "Soluble Fc gamma receptors." J Leukoc Biol **54**: 504-512.
- Fung YL, Goodison KA, Wong JK, Minchinton RM. (2003). "Investigating transfusion-related acute lung injury (TRALI)." Intern Med J **33**: 286-290.
- Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. (1990). "Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140." Nature **343**: 757-760.
- Girard D, Paquet ME, Paquin R, Beaulieu AD. (1996). "Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15." Blood **88**: 3176-3184.
- Göhring K, Wolff J, Doppl W, Schmidt KL, Fenchel K, Pralle H, Sibelius U, Bux J. (2004). "Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in



- severe bacterial infections and polycythaemia vera." Br J Haematol **126** (Jul): 252-254.
- Goldschmeding C. (1992). "Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils." Br J Haematol **81**: 336-345.
- Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB Jr. (1984). "Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme." J Exp Med **160**: 1656-1671.
- Han KS, Um TH (1997). "Frequency of neutrophil-specific antigens among Koreans using the granulocyte indirect immunofluorescence test (GIFT)." Immunohematol **13**: 15-16.
- Hannah S, Mecklenburgh K., Rahman I, Bellingan GJ, Greening A, Haslett C, Chilvers ER. (1995). "Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro." FEBS Lett **372**: 233-237.
- Holness L, Knippen MA, Simmons L, Lachenbruch PA. (2004). "Fatalities caused by TRALI." Transfus Med Rev **18**: 184-188.
- Horejsi V, Cebecauer M, Cerny J, Brdicka T, Angelisova P, Drbal K. (1998). "Signal transduction in leucocytes via GPI-anchored proteins: an experimental artefact or an aspect of immunoreceptor function?" Immunol Lett **63**: 63-73.
- Horejsi V, Drbal K, Cebecauer M, Cerny J, Brdicka T, Angelisova P, Stockinger H. (1999). "GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors." Immunol Today **20**: 356-361.
- Ilan N, Madri JA (2003). "PECAM-1: old friend, new partners." Curr Opin Cell Biol **15**: 515-524.
- Ilangumaran S, Robinson PJ, Hoessli DC. (1996). "Transfer of exogenous glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked molecules to plasma membranes." Trends Cell Biol **6**: 163-167.
- Ito I, Hayashi T, Yamada K, Kuzuya M, Naito M, Iguchi A. (1995). "Physiological concentration of estradiol inhibits polymorphonuclear leukocyte chemotaxis via a receptor mediated system." Life Sci **56**: 2247-2253.
- Jackson DE (2003). "The unfolding tale of PECAM-1." FEBS Lett **540**: 7-14.
- Kahn J, Ingraham RH, Shirley F, Migaki GI, Kishimoto TK. (1994). "Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin." J Cell Biol **125**: 461-470.
- Kerst JM, de Haas M, van der Schoot CE, Slaper-Cortenbach IC, Kleijer M, von dem Borne AE, van Oers RH. (1993). "Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically

- and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells." Blood **82**: 3265-3272.
- Kettritz R, Gaido ML, Haller H, Luft FC, Jennette CJ, Falk RJ. (1998). "Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils." Kidney Int **53**: 84-91.
- Kimberly RP, Ahlstrom JW, Click ME, Edberg JC, (1990). "The Glycosyl Phosphatidylinositol-linked FCgammaRIII mediates transmembrane Signaling events distinct from FCgammaRII." J Exp Med **171**: 1239-1255.
- Kissel K, Santoso S, Hofmann C, Stroncek D, Bux J. (2001). "Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions." Eur J Immunol **31**: 1301-1309.
- Kissel K, Scheffler S, Kerowgan M, Bux J. (2002). "Molecular nbasis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency." Blood **99**: 4231-4233.
- Kissel K (2002). "Aufklärung der Primärstruktur des granulozytenspezifischen Glykoproteins NB1 (CD177), ein Protein, welches in der Pathogenese von Immunneutropenien und Transfusionsreaktionen beteiligt ist." Dissertation: 1-114.
- Klebanoff SJ, Olszowski S, Van Voorhis WC, Ledbetter JA, Waltersdorff AM, Schlechte KG. (1992). "Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage." Blood **80**: 225-234.
- Klippel S, Strunck E, Busse CE, Behringer D, Pahl HL. (2002). "Biochemical characterization of PRV-1, a novel hematopoietic cell surface receptor, which is overexpressed in polycythemia rubra vera." Blood **100**: 2441-2448.
- Kruger C, Schutt C, Obertacke U, Joka T, Muller FE, Knoller J, Koller M, König W, Schonfeld W. (1991). "Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients." Clin Exp Immunol **85**: 297-301.
- Lalezari P, Murphy GP, Allen F (1971). "NB1, an new Neutrophil -Specific Antigen Involved in the Pathogenesis of Neonatal Neutropenia." J Clin Invest **50**: 1108-1115.
- Lalezari P, Murphy GP, Allen F (1982). "NB2, an allele of NB1 neutrophil specific anitgen; relationship to 9a." Transfusion **222**: 433.
- Lee A, Whyte MK, Haslett C. (1993). "Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators." J Leukoc Biol **54**: 283-288.
- Leger R, Palm S, Wulf H, Vosberg A, Neppert J. (1999). "Transfusion-related lung injury with leukopenic reaction caused by fresh frozen plasma containing anti-NB1." Anesthesiology **91**: 1529-1532.

- Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller WA. (1995). "Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1." J Exp Med **182**: 1337-1343.
- Liao F, Ali J, Greene T, Muller WA, (1997). "Soluble Domain 1 of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) Is Sufficient to Block Transendothelial Migration In Vitro and In Vivo." J Exp Med **185**: 1349-1357.
- Lin M, Chen CC, Wang CL, Lee HL. (1994). "Frequencies of neutrophil-specific antigens among Chinese in Taiwan." Vox Sang **66**: 247.
- Litwin M, Clark K, Noack L, Furze J, Berndt M, Albelda S, Vadas M, Gamble J. (1997). "Novel cytokine-independent induction of endothelial adhesion molecules regulated by platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31)." J Cell Biol **139**: 219-228.
- Low MG, Saltiel AR (1988). "Structural and Functional Roles of Glycosyl-Phosphatidylinositol in Membranes." Science **239**: 268-275.
- Madyastha PR, Glassman AB, Levine DH. (1984). "Incidence of neutrophil antigens on human cord neutrophils." Am J Reprod Immunol **6**: 124-127.
- Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. (2002). "Resistance to recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in neonatal alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies." Pediatrics **109**: 64.
- Mason D, Andre P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Horejsi V, Meuer S, Morrissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Uguccioni M, van der Schoot E, Vivier E, Zola H. (2002). "CD antigens 2002." Blood **99**: 3877-3880.
- Matsuo K, Lin A, Procter JL (2000). "Variations in the expression of granulocyte antigen NB1." Transfusion **40**: 654-662.
- Matsuo K, Lin A, Procter JL, Clement L, Stroncek D. (2000). "Variations in the expression of granulocyte antigen NB1." Transfusion **40**: 654-662.
- Maxfield FR, Mayor S (1997). "Cell surface dynamics of GPI-anchored proteins." Animal Tissue **47**(355-364).
- Mizukami IF, Faulkner NE, Gyetko MR, Sitrin RG, Todd RF 3rd. (1995). "Enzyme-linked immunoabsorbent assay detection of a soluble form of urokinase plasminogen activator receptor in vivo." Blood **86**: 203-211.
- McCullough J, Clay M, Kline W. (1987). "Granulocyte antigens and antibodies." Transfus Med Rev **1**: 150-160.
- McCullough J, Clay M, Kline W. (1987). "Granulocyte antigens and antibodies." Transfus Med Rev **1**(3): 150-60.

- Miyagi M, Aoyama H, Morishita M, Iwamoto Y. (1992). "Effects of sex hormones on chemotaxis of human peripheral polymorphonuclear leukocytes and monocytes." J Periodontol **63**: 28-32.
- Molloy EJ, O'Neill E, Grantham JJ, Sheridan-Pereira M, Fitzpatrick JM, Webb DW, Watson RWG, (2003). "Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone." Blood **102**: 2653-2659.
- Mnjoyan Z, Li J, Afshar-Kharghan V. (2005). "Expression of polycythemia rubra vera-1 decreases the dependency of cells on growth factors for proliferation." Haematologica **90**: 405-406.
- Muller WA (2002). "Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response." Lab Invest **82**: 521-533.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM, (1993). "PECAM-1 Is Required for Transendothelial Migration of Leukocytes." J Exp Med **178**: 449-460.
- Nardi M, Tomlinson S, Greco MA, Karpatkin S. (2001). "Complement-independent, peroxide-induced antibody lysis of platelets in HIV-1-related immune thrombocytopenia." Cell **106**: 551-561.
- Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G., (1999). "Estradiol Inhibits Leukocyte Adhesion and Transendothelial Migration in Rabbits In Vivo." Circ Res **85**: 377-385.
- Newman PJ (1997). "The Biology of PECAM-1." J Clin Invest **99**: 3-8.
- Newman PJ, Newman DK (2003). "Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**: 953-964.
- O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ. (1993). "Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase." Biochem J **290**: 41-9.
- Ohto H (1989). "Neutrophil-specific antigens and gene frequencies in Japanese." Transfusion **29**: 654.
- Passamonti F, Pietra D, Malabarba L, Rumi E, Della Porta MG, Malcovati L, Bonfichi M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. (2004). "Clinical significance of neutrophil CD177 mRNA expression in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders." Br J Haematol **126**: 650-656.
- Pericle F, Liu JH, Diaz JI, Blanchard DK, Wei S, Forni G, Djeu JY. (1994). "Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils." Eur J Immunol **24**: 440-444.

- Plesner T, Behrendt N, Ploug M. (1997). "Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR." Stem Cells **15**: 398-408.
- Pocock CF, Lucas GF, Giles C, Vassiliou G, Cwynarski K, Rezvani K, Apperley JF, Goldman JM. (2001). "Immune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies following unrelated donor stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia: perpetuation by granulocyte colony-stimulating factor." Br J Haematol **113**: 483-485.
- Robinson PJ (1997). "Signal transduction via GPI-anchored membrane proteins." Animal Tissue **48**: 365-370.
- Rubinek T, Levy R. (1993). "Arachidonic acid increases the activity of the assembled NADPH oxidase in cytoplasmic membranes and endosomes." Biochim Biophys Acta **1176**: 51-58.
- Sachs UJ, Bux J. (2003). "TRALI after the transfusion of cross-match-positive granulocytes." Transfusion **43**: 1683-1686.
- Sachs UJH, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiß T, Sibelius U, Bux J, (2006). "Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model." Blood **107**: 1217-1219.
- Sachs UJH, Andrei-Selmer C, Maniar A, Weiß T, Paddock C, Orlova VV, Choi EY, Newman PJ, Chavakis T, Santoso S, (2007). "The neutrophil specific antigen, CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)." J Biol Chem **282**: 23603-12.
- Santoso S, Orlova VV, Song K, Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Chavakis T. (2005). "The homophilic binding of junctional adhesion molecule-C mediates tumor cell-endothelial cell interactions." J Biol Chem **280**: 36326-36333.
- Segal AW (2005). "How Neutrophils Kill Microbes." Annu. Rev. Immunol **23**: 197-223.
- Sidenius N, Sier CF, Blasi F. (2000). "Shedding and cleavage of the urokinase receptor (uPAR): identification and characterisation of uPAR fragments in vitro and in vivo." FEBS Lett **475**: 52-56.
- Silliman CC, Boshkov LK, Mehdizadehkashi Z, Elzi DJ, Dickey WO, Podlosky L, Clarke G, Ambruso DR. (2003). "Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors." Blood **101**: 454-462.
- Silliman CC, Patterson AJ, Dickey WO, Stroneck DF, Popovsky MA, Caldwell SA, Ambruso DR. (1997). "The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study." Transfusion **37**: 719-726.

- Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, Elzi DJ, Tudor RM, Johnson JL, Ambruso DR. (1998). "Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model." J Clin Invest **101**: 1458-1467.
- Simon SI, Rochon YP, Lynam EB, Smith CW, Anderson DC, Sklar LA. (1993). "Beta 2-integrin and L-selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation." Blood **82**: 1097-1106.
- Sitrin RG, Todd RF, Mizukami IF, Gross TJ, Shollenberger SB, Gyetko MR, (1994). "Cytokine-specific regulation of urokinase receptor (CD87) expression by U937 mononuclear phagocytes." Blood **84**: 1268-1275.
- Skubitz KM, Stroncek DF, Sun B. (1991). "Neutrophil-specific antigen NB1 is anchored via a glycosyl-phosphatidylinositol linkage." J Leukoc Biol **49**: 163-171.
- Sloand EM, Maciejewski JP, Dunn D, Moss J, Brewer B, Kirby M, Young NS. (1998). "Correction of the PNH defect by GPI-anchored protein transfer." Blood **92**: 4439-4445.
- Smith CW, Hollers JC (1980). "Motility and Adhesiveness in Human Neutrophils." J Clin Invest **65**: 804-812.
- Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, Vestweber D. (1997). "The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface." J Cell Sci **110**: 687-694.
- Stefano GB, Peter D (2001). "Cell surface estrogen receptors coupled to cNOS mediate immune and vascular tissue regulation: therapeutic implications." Med Sci Monit **7**: 1066-1074.
- Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerk W, Strass B, Schnabl E, Knapp W. (1990). "Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31." J Immunol **145**: 3889-3897.
- Stroncek D, Bux J. (2002). "Is it time to standardize granulocyte alloantigen nomenclature?" Transfusion **42**: 393-395.
- Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M. (2004). "CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera." J Transl Med **2**: 8.
- Stroncek DF, Herr GP, Plachta LB. (1994). "Neutrophil-specific antigen NB1 inhibits neutrophil-endothelial cell interactions." J Lab Clin Med **123**: 247-255.
- Stroncek DF, Skubitz KM, McCullough JJ. (1990). "Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1." Blood **75**: 744-55.
- Stroncek DF, Shankar RA, Filipovich AH, Plachta LB, Clay ME. (1993b). "Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation." Transfusion **33**: 158-163.

- Stroncek DF, Shankar RA, Noren PA, Herr GP, Clement LT. (1996). "Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies." Transfusion **36**: 168-174.
- Stroncek DF, Shankar RA, Plachta LB, Clay ME, Dalmasso AP. (1993a). "Polyclonal antibodies against the NB1-bearing 58- to 64-kDa glycoprotein of human neutrophils do not identify an NB2-bearing molecule." Transfusion **33**: 399-404.
- Stroncek DF, Shankar RA, Noren PA, Herr GP, Clement LT. (1993d). "Analysis of the expression of neutrophil-specific antigen NB1: characterization of neutrophils that react with but are not agglutinated by anti-NB1." Transfusion: 656-660.
- Stroncek DF. (1998a). "The expression of the NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords." Transfus Med **8**: 119-123.
- Stroncek DF. (1998b). "Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor." Transfusion **38**: 663-668.
- Su WH, Chen H, Jen CJ, (2002). "Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium." Blood **100**: 3597-3603.
- Sun J, Paddock C, Shubert J, Zhang HB, Amin K, Newman PJ, Albelda SM. (2000). "Contributions of the extracellular and cytoplasmic domains of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) in regulating cell-cell localization." J Cell Sci **113**: 1459-1469.
- Taniguchi K, Kobayashi M, Harada H, Hiraoka A, Tanihiro M, Takata N, Kimura A. (2002). "Human neutrophil antigen-2a expression on neutrophils from healthy adults in western Japan." Transfusion **42**.
- Taniguchi K, Nagata H, Katsuki T, Nakashima C, Onodera R, Hiraoka A, Takata N, Kobayashi M, Kambe M. (2004). "Significance of human neutrophil antigen-2a (NB1) expression and neutrophil number in pregnancy." Transfusion **44**: 581-585.
- Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Roder S, Lubbert M, Lange W, Azemar M, Meinhardt G, Schaefer HE, Pahl HL. (2000). "Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera." Blood **95**: 2569-2576.
- Thompson RD, Noble KE, Larbi KY, Dewar A, Duncan GS, Mak TW, Nourshargh S. (2001). "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane." Blood **97**: 1854-1860.
- Varki A (1994). "Selectin ligands." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 7390-7397.

- Vestweber D, Blanks JE (1999). "Mechanisms that Regulate the Function of the Selectins and their Ligands." Physiol. Reviews **79**: 181-213.
- Wagner JG, Roth RA (2000). "Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature." Pharmacol Rev **52**: 349-374.
- Wang Q, Doerschuk CM (2001). "The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation." J Immunol **166**: 6877-6884.
- Wang S, Dangerfield JP, Young RE, Nourshargh S. (2005). "PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration." J Cell Sci **118**: 2067-2076.
- Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB, Parodo J, Marshall JC. (1997). "Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement." J Immunol **158**: 945-953.
- Weiβ T, Sachs UJH, Little S, Bein G, Santoso S, (2008). "Human neutrophil specific CD177 (NB1) exists as soluble protein and is increased upon inflammatory stimuli." in Vorbereitung.
- Wilhelm OG, Wilhelm S, Escott GM, Lutz V, Magdolen V, Schmitt M, Rifkin DB, Wilson EL, Graeff H, Brunner G. (1999). "Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression." J Cell Physiol **180**: 225-235.
- Wolff J, Brendel C, Fink L, Bohle RM, Kissel K, Bux J. (2003). "Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms." Blood **102**: 731-733.
- Yan HC, Pilewski JM, Zhang Q, DeLisser HM, Romer L, Albelda SM. (1995). "Localization of multiple functional domains on human PECAM-1 (CD31) by monoclonal antibody epitope mapping." Cell Adhes Commun **3**: 45-66.
- Yasui K, Sekiguchi Y, Ichikawa M, Nagumo H, Yamazaki T, Komiyama A, Suzuki H. (2002). "Granulocyte macrophage-colony stimulating factor delays neutrophil apoptosis and primes its function through Ia-type phosphoinositide 3-kinase." J Leukoc Biol **72**: 1020-1026.
- Zhao T, Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. (2003). "The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils." J Clin Invest **112**: 1732-1740.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. (1996). "Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions." J Clin Invest **98**: 1699-1702.



## 8 Anhang

### 8.1 NB1-Standardkurve

<b>PRV-Protein<sup>1</sup></b>	<b>0,15</b>	<b>0,25</b>	<b>0,50</b>	<b>0,75</b>	<b>1,00</b>	<b>1,50</b>	<b>2,00</b>
<b>Ansatz Ia<sup>2</sup></b>	0,026	0,147	0,431	0,838	1,354	2,115	2,418
<b>Ansatz Ib<sup>2</sup></b>	0,036	0,126	0,402	0,747	1,23	1,977	2,491
<b>Ansatz Ic<sup>2</sup></b>	0,026	0,156	0,462	0,739	1,144	1,958	2,39
<b>Ansatz Iia<sup>2</sup></b>	0,09	0,211	0,495	0,902	1,418	2,179	2,482
<b>Ansatz Iib<sup>2</sup></b>	0,1	0,19	0,468	0,807	1,294	2,041	2,555
<b>Ansatz Iic<sup>2</sup></b>	0,09	0,22	0,526	0,803	1,208	2,022	2,454
<b>Ansatz IIIa<sup>2</sup></b>	0,13	0,206	0,433	0,899	1,505	2,215	2,359
<b>Ansatz IIIb<sup>2</sup></b>	0,121	0,203	0,41	1,14	1,524	2,371	2,473
<b>Ansatz IIIc<sup>2</sup></b>	0,098	0,214	0,477	0,86	1,037	2,274	2,343
<b>Mittelwert</b>	0,08	0,19	0,46	0,86	1,30	2,13	2,44
<b>Variation<sup>3</sup></b>	0,095	0,094	0,124	0,163	0,361	0,413	0,212
<b>Standard- Abweichung (SD)</b>	0,04	0,03	0,04	0,11	0,15	0,13	0,07
<b>Sensitivität<sup>4</sup></b>	0,198	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

**Tab. 8.1: Standardkurve zur quantitativen Bestimmung des NB1-Zellgehalts mittel ELISA**

<sup>1</sup>Eingesetzte Menge an PRV-Protein in ng pro Vertiefung

<sup>2</sup>Werte gemessen als Optische Dichte bei einer Absorption von 492 nm

<sup>3</sup>Variation = Differenz zwischen dem Maximalwert und Minimalwert einer Verdünnungsstufe

<sup>4</sup>Sensitivität = Rangkorrelationstest (p) für unabhängige Stichproben

## 8.2 NB1-Phänotyp

Nr.	Geschlecht, Alter	NB1 (+) <sup>1</sup>	Oberflächen- konzentration <sup>2</sup>	Oberfläche, gesamt <sup>3</sup>	OD <sup>4</sup>	Gesamt- gehalt <sup>5</sup>
1	M 48	77	39.000	3003 x 10 <sup>3</sup>	1,72	90,0
2	M 33	38	15.000	570 x 10 <sup>3</sup>	1,65	86,6
3	M 41	38	15.000	570 x 10 <sup>3</sup>	2,58	131,9
4	W 41	47	16.000	752 x 10 <sup>3</sup>	2,23	114,8
5	M 35	15	10.000	150 x 10 <sup>3</sup>	0,98	54,0
6	M 28	55	26.000	1430 x 10 <sup>3</sup>	1,80	93,9
7	M 40	32	37.000	1184 x 10 <sup>3</sup>	1,37	73,0
8	W 25	39	33.000	1287 x 10 <sup>3</sup>	1,70	89,2
9	M 55	59	25.000	1475 x 10 <sup>3</sup>	2,08	107,5
10	W 30	60	35.000	2100 x 10 <sup>3</sup>	1,80	93,9
11	M 31	17	20.000	340 x 10 <sup>3</sup>	1,21	65,2
12	W 22	71	40.000	2840 x 10 <sup>3</sup>	2,63	134,3
13	M 31	64	30.000	1920 x 10 <sup>3</sup>	2,22	114,3
14	M 45	69	16.000	1104 x 10 <sup>3</sup>	1,55	81,8
15	M 49	25	18.000	450 x 10 <sup>3</sup>	1,00	55,0
16	W 33	48	20.000	960 x 10 <sup>3</sup>	1,82	94,9
17	M 44	57	40.000	2280 x 10 <sup>3</sup>	2,07	107,0
18	M 67	46	21.000	966 x 10 <sup>3</sup>	1,26	67,7
19	W 65	40	34.000	1360 x 10 <sup>3</sup>	1,16	62,8
20	M 38	56	43.000	2408 x 10 <sup>3</sup>	2,08	107,5
21	M 53	54	32.000	1728 x 10 <sup>3</sup>	1,82	94,9
22	M 31	41	29.000	1189 x 10 <sup>3</sup>	1,53	80,8
23	M 63	66	14.000	924 x 10 <sup>3</sup>	2,55	130,4
24	M 24	55	30.000	1650 x 10 <sup>3</sup>	2,44	125,0
25	M 24	40	22.000	880 x 10 <sup>3</sup>	1,18	63,8
26	M 43	48	26.000	1248 x 10 <sup>3</sup>	1,76	92,0
27	W 36	54	24.000	1296 x 10 <sup>3</sup>	1,24	66,7
28	W 28	52	32.000	1664 x 10 <sup>3</sup>	1,58	83,2
29	W 29	48	38.000	1824 x 10 <sup>3</sup>	1,75	91,5
30	W 30	41	37.000	1517 x 10 <sup>3</sup>	1,30	69,6

**Tab. 8.2 (1): NB1-Expression, -Oberflächenkonzentration und -Gesamtgehalt der Testpersonen**

<sup>1</sup>Prozentualer Anteil NB1-positiver Zellen. <sup>2</sup>Durchschnittliche Zahl an NB1-Oberflächenmolekülen pro NB1-positiver Zelle. <sup>3</sup>Gesamtoberflächengehalt, entspricht der NB1-Expression multipliziert mit der Oberflächenkonzentration. <sup>4</sup>Optische Dichte bei einer Absorption von 492 nm. <sup>5</sup>Zellulärer Gesamtgehalt an NB1 in ng pro 1 ml Zelllysat.

Nr.	Geschlecht, Alter	NB1 (+) <sup>1</sup>	Oberflächen- konzentration <sup>2</sup>	Oberfläche, gesamt <sup>3</sup>	OD <sup>4</sup>	Gesamt- gehalt <sup>5</sup>
-----	----------------------	----------------------	--	------------------------------------	-----------------	--------------------------------

31	M 56	62	77.000	4774 x 10 <sup>3</sup>	1,64	86,1
32	M 46	84	47.000	3948 x 10 <sup>3</sup>	2,73	139,1
33	W 28	40	33.000	1320 x 10 <sup>3</sup>	1,76	92,0
34	M 33	28	31.000	868 x 10 <sup>3</sup>	0,99	54,5
35	W 61	63	12.000	756 x 10 <sup>3</sup>	1,25	67,2
36	M 25	64	46.000	2944 x 10 <sup>3</sup>	2,35	120,7
37	W 23	36	46.000	1656 x 10 <sup>3</sup>	2,44	125,0
38	M 28	74	48.000	3552 x 10 <sup>3</sup>	2,56	130,9
39	M 64	69	31.000	2139 x 10 <sup>3</sup>	1,73	90,5
40	W 23	79	69.000	5451 x 10 <sup>3</sup>	1,43	75,9
41	M 38	6	76.000	456 x 10 <sup>3</sup>	0,42	26,8
42	W 36	5	30.000	150 x 10 <sup>3</sup>	0,28	20,0
43	W 39	79	51.000	4029 x 10 <sup>3</sup>	2,27	116,8
44	M 47	19	24.000	456 x 10 <sup>3</sup>	0,23	17,6
45	M 35	73	28.000	2044 x 10 <sup>3</sup>	2,82	143,5
46	W 27	60	56.000	3360 x 10 <sup>3</sup>	2,14	110,4
47	M 47	16	24.000	384 x 10 <sup>3</sup>	1,08	58,9
48	M 46	39	38.000	1482 x 10 <sup>3</sup>	1,32	70,6
49	M 29	54	34.000	1836 x 10 <sup>3</sup>	1,76	92,0
50	M 34	54	30.000	1620 x 10 <sup>3</sup>	1,11	60,4
51	W 27	50	45.000	2250 x 10 <sup>3</sup>	1,79	93,4
52	W 23	47	39.000	1833 x 10 <sup>3</sup>	1,25	67,2
53	W 24	48	44.000	2112 x 10 <sup>3</sup>	1,30	69,6
54	W 30	42	43.000	1806 x 10 <sup>3</sup>	1,28	68,6
55	M 29	43	33.000	1419 x 10 <sup>3</sup>	0,74	42,4
56	M 22	65	37.000	2405 x 10 <sup>3</sup>	0,83	46,7
57	M 30	51	45.000	2295 x 10 <sup>3</sup>	1,10	59,9
58	W 42	69	25.000	1725 x 10 <sup>3</sup>	2,02	104,6
59	W 39	68	15.000	1020 x 10 <sup>3</sup>	2,33	119,7
60	W 39	77	33.000	2541 x 10 <sup>3</sup>	2,24	115,3
61	M 30	75	40.000	3000 x 10 <sup>3</sup>	1,99	103,1
62	W 36	51	48.000	2448 x 10 <sup>3</sup>	1,05	57,4

**Tab. 8.2 (2):** <sup>1</sup>Prozentualer Anteil NB1-positiver Zellen. <sup>2</sup>Durchschnittliche Zahl an NB1-Oberflächenmolekülen pro NB1-positiver Zelle. <sup>3</sup>Gesamtoberflächengehalt, entspricht der NB1-Expression multipliziert mit der Oberflächenkonzentration. <sup>4</sup>Optische Dichte bei einer Absorption von 492 nm. <sup>5</sup>Zellulärer Gesamtgehalt an NB1 in ng pro 1 ml Zelllysats.

Nr.	Geschlecht, Alter	NB1 (+) <sup>1</sup>	Oberflächen- Konzentration <sup>2</sup>	Oberfläche, gesamt <sup>3</sup>	OD <sup>4</sup>	Gesamt- gehalt <sup>5</sup>
-----	----------------------	----------------------	--	------------------------------------	-----------------	--------------------------------

63	W 35	62	43.000	2666 x 10 <sup>3</sup>	1,28	68,6
64	W 34	37	40.000	1480 x 10 <sup>3</sup>	2,47	126,5
65	W 56	29	56.000	1624 x 10 <sup>3</sup>	2,34	120,2
66	W 39	73	33.000	2409 x 10 <sup>3</sup>	2,41	123,6
67	W 48	1	25.000	25 x 10 <sup>3</sup>	1,40	74,5
68	M 46	65	50.000	3250 x 10 <sup>3</sup>	2,46	126,0
69	W 27	64	56.000	3584 x 10 <sup>3</sup>	1,93	100,2
70	W 27	8	2.000	16 x 10 <sup>3</sup>	0,85	47,7
71	W 24	55	20.000	1100 x 10 <sup>3</sup>	2,20	113,4
72	W 27	8	36.000	288 x 10 <sup>3</sup>	0,86	48,2
73	M 53	8	20.000	160 x 10 <sup>3</sup>	1,28	68,6
74	M 48	49	33.000	1617 x 10 <sup>3</sup>	1,10	59,9
75	W 39	6	24.000	144 x 10 <sup>3</sup>	1,96	101,7
76	W 45	4	30.000	120 x 10 <sup>3</sup>	2,02	104,6
77	W 48	49	53.000	2597 x 10 <sup>3</sup>	2,62	133,8
78	W 43	55	37.000	2035 x 10 <sup>3</sup>	2,77	141,1
79	W 28	69	33.000	2277 x 10 <sup>3</sup>	2,59	132,4
80	M 51	61	21.000	1281 x 10 <sup>3</sup>	2,51	128,4
81	W 52	33	15.000	495 x 10 <sup>3</sup>	2,32	119,2
82	W 27	39	10.000	390 x 10 <sup>3</sup>	1,43	75,9
83	M 28	44	36.000	1584 x 10 <sup>3</sup>	1,50	79,3
84	M 49	73	48.000	3504 x 10 <sup>3</sup>	0,65	38,0
85	M 34	32	59.000	1888 x 10 <sup>3</sup>	0,47	29,2
86	M 52	60	21.000	1260 x 10 <sup>3</sup>	2,46	126,0
87	M 23	19	46.000	874 x 10 <sup>3</sup>	0,91	50,6
88	W 38	62	76.000	4712 x 10 <sup>3</sup>	2,32	119,2
89	W 34	34	48.000	1632 x 10 <sup>3</sup>	1,51	79,8
90	W 27	49	60.000	2940 x 10 <sup>3</sup>	1,58	83,2
91	W 25	69	44.000	3036 x 10 <sup>3</sup>	2,32	119,2
92	M 27	66	56.000	3696 x 10 <sup>3</sup>	2,54	129,9
93	W 50	< 1	15.000	15 x 10 <sup>3</sup>	1,10	59,9
94	W 26	< 1	25.000	12,5 x 10 <sup>3</sup>	1,85	96,3

**Tab. 8.2 (3): NB1-Expression, -Oberflächenkonzentration und -Gesamtgehalt der Testpersonen**

<sup>1</sup>Prozentualer Anteil NB1-positiver Zellen. <sup>2</sup>Durchschnittliche Zahl an NB1-Oberflächenmolekülen pro NB1-positiver Zelle. <sup>3</sup>Gesamtoberflächengehalt, entspricht der NB1-Expression multipliziert mit der Oberflächenkonzentration. <sup>4</sup>Optische Dichte bei einer Absorption von 492 nm. <sup>5</sup>Zellulärer Gesamtgehalt an NB1 in ng pro 1 ml Zelllysate.

### 8.3 Konstanz der NB1-Expression und NB1-Oberflächenkonzentration

#### 8.3.1 NB1-Expression

Person	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
--------	----	----	----	----	----	----	----	----

<b>Geschlecht</b>	M	M	M	M	M	W	W	W
<b>Messwert 1</b>	57	49	77	19	44	74	18	34
<b>Messwert 2</b>	65	52	44	19	32	21	40	9
<b>Messwert 3</b>		47	73		41	79		
<b>Messwert 4</b>			64		38			
<b>Messwert 5</b>					44			
<b>Messwert 6</b>					33			
<b>Messwert 7</b>					53			
<b>Messwert 8</b>					53			
<b>Median</b>	61	49	68,5	19	42,5	74	29	21,5
<b>Differenz Min. – Max.</b>	8	5	33	1	21	58	22	25

Person	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16
--------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

<b>Geschlecht</b>	W	W	W	W	W	W	W	W
<b>Messwert 1</b>	56	24	49	0	49	69	19	79
<b>Messwert 2</b>	65	42	75	1	52	57	28	84
<b>Messwert 3</b>	56			3	42		34	
<b>Messwert 4</b>	70			3	58		54	
<b>Median</b>	60,5	33	62	2	50,5	63	31	81,5
<b>Differenz Min. – Max.</b>	14	18	26	3	16	12	35	5

Person	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24
<b>Geschlecht</b>	W	W	W	W	W	W	W	W
<b>Messwert 1</b>	51	54	70	57	52	58	23	0
<b>Messwert 2</b>	50	64	68	73	52	17	29	2
<b>Messwert 3</b>	46				68	37	10	1
<b>Messwert 4</b>							34	0
<b>Messwert 5</b>							32	0
<b>Messwert 6</b>							43	0
<b>Median</b>	50	59	69	65	52	37	30,5	0
<b>Differenz Min. – Max.</b>	5	10	2	16	16	41	33	2

**Tab. 8.3 (1):** Messung der NB1-positiven Subpopulation (%) über verschiedene Zeiträume bei 24 verschiedenen Testpersonen

### 8.3.2 NB1-Oberflächenkonzentration

Person	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
<b>Geschlecht</b>	M	M	M	M	M	W	W	W
<b>Messwert 1</b>	29	56	17	46	36	29	9	48
<b>Messwert 2</b>	47	59	12	46	12	17	26	40
<b>Messwert 3</b>		62	25		32	21		
<b>Messwert 4</b>			51		15			
<b>Messwert 5</b>					20			
<b>Messwert 6</b>					11			
<b>Messwert 7</b>					26			
<b>Messwert 8</b>					31			
<b>Median</b>	38	59	21	46	23	21	17,5	44
<b>Differenz Min. – Max.</b>	18	16	39	0	25	12	17	8

Person	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16
<b>Geschlecht</b>	W	W	W	W	W	W	W	W
<b>Messwert 1</b>	47	51	62	n.a.	8	44	24	40
<b>Messwert 2</b>	51	19	56	14	22	43	16	59
<b>Messwert 3</b>	56			16	25		28	
<b>Messwert 4</b>	70			9	8		27	
<b>Median</b>	53,5	35	59	14	15	43,5	24	49,5
<b>Differenz Min. – Max.</b>	23	32	6	7	17	1	12	19

Person	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24
<b>Geschlecht</b>	W	W	W	W	W	W	W	W
<b>Messwert 1</b>	50	63	77	35	50	8	15	n.a.
<b>Messwert 2</b>	11	46	24	67	17	14	53	17
<b>Messwert 3</b>	72				17	10	42	32
<b>Messwert 4</b>							20	n.a.
<b>Messwert 5</b>							24	n.a.
<b>Messwert 6</b>							38	n.a.
<b>Median</b>	50	54,5	50,5	51	17	10	42	24,5
<b>Differenz Min. – Max.</b>	61	17	53	32	33	6	38	15

**Tab. 8.3 (B):** Messung der NB1-Oberflächenkonzentration (Anzahl der Moleküle x 10<sup>3</sup> pro Zelle) über verschiedene Zeiträume bei 24 Testpersonen.



#### 8.4 NB1-Plasmagehalt

Nr.	Geschlecht, Alter	NB1 (+) <sup>1</sup>	Oberflächen- konzentration <sup>2</sup>	Oberfläche gesamt <sup>3</sup>	OD, Plasma <sup>4</sup>	Plasma- gehalt <sup>5</sup>
1	M 33	38	15.000	555 x 10 <sup>3</sup>	1,53	25,2
2	M 40	32	37.000	1190 x 10 <sup>3</sup>	0,89	15,8
3	W 25	39	33.000	1270 x 10 <sup>3</sup>	0,67	12,6
4	M 55	59	25.000	1450 x 10 <sup>3</sup>	0,62	12,2
5	W 30	60	35.000	2070 x 10 <sup>3</sup>	0,64	12,4
6	W 22	71	40.000	2860 x 10 <sup>3</sup>	2,22	35,2
7	M 31	64	30.000	1925 x 10 <sup>3</sup>	1,42	23,6
8	M 45	69	16.000	1118 x 10 <sup>3</sup>	0,78	14,2
9	W 33	48	20.000	965 x 10 <sup>3</sup>	0,44	9,3
10	M 44	57	40.000	2263 x 10 <sup>3</sup>	1,18	20,0
11	M 67	46	21.000	948 x 10 <sup>3</sup>	0,73	13,6
12	W 65	40	34.000	1360 x 10 <sup>3</sup>	0,61	11,8
13	W 38	56	43.000	2525 x 10 <sup>3</sup>	1,19	20,2
14	M 53	54	32.000	1701 x 10 <sup>3</sup>	0,87	15,5
15	M 31	41	29.000	1169 x 10 <sup>3</sup>	0,67	12,6
16	M 24	40	22.000	850 x 10 <sup>3</sup>	0,6	11,6
17	M 56	62	77.000	4755 x 10 <sup>3</sup>	1,03	17,9
18	W 61	63	12.000	769 x 10 <sup>3</sup>	0,61	11,8
19	M 28	74	48.000	3559 x 10 <sup>3</sup>	0,85	15,2
20	M 38	6	76.000	455 x 10 <sup>3</sup>	0,63	12,0
21	M 35	73	28.000	2029 x 10 <sup>3</sup>	0,92	16,3
22	W 39	77	33.000	2564 x 10 <sup>3</sup>	1,21	20,5
23	M 30	75	40.000	3008 x 10 <sup>3</sup>	1,12	19,5
24	W 35	62	22.000	1339 x 10 <sup>3</sup>	0,98	17,2

Nr.	Geschlecht, Alter	NB1 (+) <sup>1</sup>	Oberflächen- konzentration <sup>2</sup>	Oberfläche gesamt <sup>3</sup>	OD, Plasma <sup>4</sup>	Plasma- gehalt <sup>5</sup>
25	W 34	37	40.000	1495 x 10 <sup>3</sup>	1,1	18,9
26	W 39	29	56.000	1630 x 10 <sup>3</sup>	1,6	26,2
27	W 45	73	33.000	2416 x 10 <sup>3</sup>	1,14	19,5
28	W 48	1	25.000	25 x 10 <sup>3</sup>	0,67	12,2
29	M 46	65	50.000	3250 x 10 <sup>3</sup>	1,26	21,2
30	W 29	64	56.000	3584 x 10 <sup>3</sup>	1,39	23,1
31	W 52	55	19.000	1062 x 10 <sup>3</sup>	2,38	37,6
32	M 51	61	21.000	1250 x 10 <sup>3</sup>	0,52	10,4
33	W 29	33	15.000	491 x 10 <sup>3</sup>	0,96	16,8
34	W 27	39	9.000	351 x 10 <sup>3</sup>	0,77	14,1

**Tab. D: NB1-Plasmagehalt von 34 Testpersonen**

<sup>1</sup>Prozentualer Anteil NB1-positiver Zellen. <sup>2</sup>Durchschnittliche Zahl an NB1-Oberflächenmolekülen pro NB1-positiver Zelle. <sup>3</sup>Gesamtoberflächengehalt, entspricht der NB1-Expression multipliziert mit der Oberflächenkonzentration. <sup>4</sup>Optische Dichte bei einer Absorption von 492 nm. <sup>5</sup>Gehalt an löslichen NB1 in ng pro 1 ml Plasma.

## 8.5 In Vitro Zellstimulation

Nr.	NB1-Expression (%) nach 30 min				NB1-Expression (%) nach 24 Std.			
	ohne	fMLP	GCSF	Östrogen	ohne	fMLP	GCSF	Östrogen
1	58	68	62	63	67	61	62	60
2	12	16	5	3	18	18	19	17
3	40	40	39	40	53	58	59	57
4	64	64	63	64	83	83	85	86
5	43	45	42	44	68	61	59	69
6	66	61	63	66	76	83	76	77
7	52	53	53	52	72	69	69	71
8	3	3	5	6	18	17	20	18
9	63	59	63		83	76	76	
10	73	71	62		89	91	89	
11	34	38	39		53	43	43	
12	73	76	74		78	77	79	
13	37	38	38		54	48	49	
14	36	44	47		48	44	46	
15	52	52	51		54	53	57	
16	56	66	60		60	59	61	
17	24	23	25		32	31	35	
18	26	26	26		26	30	31	
19	53	60	64		59	61	53	
20	76	74	73		75	77	79	
21	76	79	78		88	85	84	
22	67	74	77		77	79	77	
23	74	74	74		83	83	83	
24	63	66	72		90	86	89	
25	74	73	67		92	99	99	
26	39	41	38		56	57	56	
27	66	61	63		77	73	72	
28	17	21	17		30	30	31	
29	53	54	59		69	74	64	
30	42	41	39		63	60	60	

	NB1-Oberflächenkonzentration (x 10 <sup>3</sup> ) nach 30min				NB1-Oberflächenkonzentration (x 10 <sup>3</sup> ) nach 24 Std.			
Nr.	ohne	fMLP	GCSF	Östrogen	ohne	fMLP	GCSF	Östrogen
1	56	70	71	67	72	75	76	75
2	13	7	16	16	15	19	21	19
3	26	44	26	36	58	50	52	55
4	51	76	43	43	96	101	105	109
5	38	59	43	48	31	39	39	33
6	40	51	40	41	47	57	49	49
7	31	45	31	32	36	38	36	35
8	9	8	11	11	9	10	10	9
9	33	44	32		40	40	48	
10	51	91	72		87	97	85	
11	28	42	39		27	33	30	
12	67	81	80		67	57	72	
13	53	62	61		35	37	36	
14	22	30	26		27	30	45	
15	53	59	67		55	68	57	
16	18	35	33		44	44	42	
17	33	40	37		54	41	57	
18	35	41	45		39	38	43	
19	53	59	69		45	40	41	
20	49	65	60		61	52	56	
21	31	48	44		36	35	33	
22	16	24	27		21	27	22	
23	20	23	24		16	19	17	
24	32	64	58		34	48	42	
25	66	80	78		39	51	46	
26	21	29	31		24	18	22	
27	59	77	73		61	67	66	
28	78	89	91		69	79	75	
29	43	48	49		41	36	41	
30	49	66	62		44	44	47	

## 9 Publikationen, Vorträge und Poster

### Publikationen:

Sachs UJH, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiß T, Sibelius U, Bux J, (2006). "Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model." Blood **107**: 1217-1219.

Sachs UJH, Andrei-Selmer C, Maniar A, Weiß T, Paddock C, Orlova VV, Choi EY, Newman PJ, Chavakis T, Santoso S, (2007). "The neutrophil specific antigen, CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)." J Biol Chem **282**: 23603-12.

Weiß T, Sachs UJH, Little S, Bein G, Santoso S, (2008). "Human neutrophil specific CD177 (NB1) exists as soluble protein and is increased upon inflammatory stimuli." in Vorbereitung.

### Vorträge:

Weiß T., Bux J., Bein G., Santoso S., Sachs U.J.  
Variable Expression of NB1: Genetic Variants and Correlation between Surface and Total NB1 Expression.  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Mannheim, 2004.

### Poster:

Weiß T., Bux J., Bein G., Santoso S., Sachs U.J.  
Variable Expression of NB1: Genetic Variants and Correlation between Surface and Total NB1 Expression.  
-Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Mannheim, 2004  
-European Symposium of Platelet and Granulocyte Immunobiology, Rust, 2004

## 10 Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten“.

## 11 Danksagung

Meinen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gregor Bein für die Überlassung des interessanten Themas, der Bereitstellung der umfangreichen Laboreinrichtung und die kompetente fachliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Manfred Reinacher danke ich für seine Unterstützung auf veterinärmedizinischer Seite.

Bei Herrn Dr. med. Ulrich Sachs bedanke ich mich für seine kompetente, engagierte Betreuung, ebenso bei Dr. rer. nat. Sentot Santoso.

Für praktische Hilfestellungen im Labor danke ich den Frauen Christine Hofmann, Marion Wallon, Steffanie Scheffler, Silke Werth und Olga Eva.

Frau Petra Kronich aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie danke ich für die Durchführung der Ultraschallzentrifugation.

Bei Herrn Werner von Wulffen aus dem Zentrum für Innere Medizin bedanke ich mich für die Arbeit am Zellsorter.

MUTIG'99 danke ich aus Prinzip.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5333-8

